

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5721951号
(P5721951)

(45) 発行日 平成27年5月20日(2015.5.20)

(24) 登録日 平成27年4月3日(2015.4.3)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19

請求項の数 32 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-554586 (P2009-554586)	(73) 特許権者	507349455
(86) (22) 出願日	平成20年3月21日(2008.3.21)		バイオジェン アイデック マサチューセ
(65) 公表番号	特表2010-521967 (P2010-521967A)		ッツ インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成22年7月1日(2010.7.1)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O2
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/003735		142 ケンブリッジ ケンブリッジ セ
(87) 国際公開番号	W02008/118356		ンター 14
(87) 国際公開日	平成20年10月2日(2008.10.2)	(73) 特許権者	507188474
審査請求日	平成23年3月16日(2011.3.16)		ユージービー ファーマ エス. エー.
(31) 優先権主張番号	60/919,816		ベルギー国 ビー - 1070 ブラッ
(32) 優先日	平成19年3月22日(2007.3.22)		セル アレデ ラ レシエルシェ 60
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/919,938		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成19年3月22日(2007.3.22)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体、抗体誘導体、および抗体断片を含む、CD154に特異的に結合する結合タンパク質ならびにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 4、およびSEQ ID NO : 5にそれぞれ示される重鎖CDR1、CDR2およびCDR3配列、および

SEQ ID NO : 6、SEQ ID NO : 7、およびSEQ ID NO : 8にそれぞれ示される軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3配列

を含む、CD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】

(a) SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 10、SEQ ID NO : 11より選択されるV_Hドメイン配列;および、

(b) SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 14より選択されるV_Lドメイン配列を含む、請求項1記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

(a) SEQ ID NO : 1およびSEQ ID NO : 2 ;

(b) SEQ ID NO : 11およびSEQ ID NO : 2 ;

(c) SEQ ID NO : 9およびSEQ ID NO : 14;ならびに

(d) SEQ ID NO : 10およびSEQ ID NO : 14

より選択されるV_HおよびV_Lドメイン配列を含む、請求項2記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】

該抗体が、

(a)SEQ ID NO : 12、SEQ ID NO : 13、およびSEQ ID NO : 72より選択される重鎖配列 ; ならびに、

(b)SEQ ID NO : 15およびSEQ ID NO : 69より選択される軽鎖配列を含む、請求項1記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

該抗体が、

(a) SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 15 ;

(b) SEQ ID NO : 13およびSEQ ID NO : 15 ; ならびに

(c) SEQ ID NO : 72およびSEQ ID NO : 69

より選択される重鎖および軽鎖の配列を含む、請求項4記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

該抗体が、それぞれSEQ ID NO : 13およびSEQ ID NO : 15である重鎖および軽鎖の配列を含む、請求項5記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

該抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、霊長類化抗体、およびヒト化抗体より選択される、請求項1記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

該抗体が、多量体抗体、ヘテロ二量体抗体、ヘミ二量体(hemidimeric)抗体、四価の抗体、二重特異性抗体、および単鎖抗体より選択される、請求項1~7のいずれか一項記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

該断片が、Fab、F(ab)₂、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fv、およびドメイン抗体より選択される、請求項1~8のいずれか一項記載の抗原結合断片。

【請求項 10】

機能的部分の結合を可能にする1つまたは複数のアミノ酸を重鎖のC末端に付加することによって修飾されたFabである、請求項9記載の抗原結合断片。

【請求項 11】

該抗体が、CD154結合に関して一価である、請求項1~10のいずれか一項記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 12】

機能的部分の共有結合によって修飾されている、請求項1~11のいずれか一項記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 13】

機能的部分がポリ(エチレングリコール)またはその誘導体である、請求項12記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 14】

抗原結合断片がFab'であり、修飾されたヒンジ領域のチオール基が、リジン残基に共有結合するマレイミド基に共有結合し、約20,000Daの分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)ポリマーがリジンの各アミン基に結合している、請求項13記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 15】

該抗原結合断片が免疫グロブリンFc領域を欠く、請求項1、2、または3記載の抗原結合断片。

【請求項 16】

該結合抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4 Fc領域より選択されるか、またはIgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4 Fc領域に由来する、免疫グロブリンFc領域を含む、請求項1、2、または3記載のCD154結合抗体。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

該結合抗体が、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む、請求項1、2、または3記載のCD154結合抗体。

【請求項18】

変種Fc領域が、複数のIg Fcドメインタイプに由来する配列を含むハイブリッドFc領域である、請求項17記載のCD154結合抗体。

【請求項19】

該結合抗体がグリコシル化されていない、請求項1～18のいずれか一項記載のCD154結合抗体。

【請求項20】

低いエフェクター機能が、Fcレセプター(FcR)への減少した結合である、請求項17または18記載のCD154結合抗体。 10

【請求項21】

低いエフェクター機能が、補体タンパク質への減少した結合である、請求項17または18記載のCD154結合抗体。

【請求項22】

該結合抗体または断片が機能的部分に連結されている、請求項1～21のいずれか一項記載のCD154結合抗体または抗原結合断片。

【請求項23】

請求項1～22のいずれか一項記載のCD154結合抗体または抗原結合断片をコードする、核酸分子。 20

【請求項24】

請求項23記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項25】

請求項24記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項26】

(a)宿主細胞にCD154結合抗体または抗原結合断片を発現させるのに適した条件下で、請求項25記載の宿主細胞を培養する段階、および、

(b)CD154結合抗体または抗原結合断片を回収する段階を含む、CD154結合抗体またはその抗原結合断片を産生するための方法。

【請求項27】 30

宿主細胞が、原核細胞または真核細胞である、請求項26記載の方法。

【請求項28】

請求項1～22のいずれか一項記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片と、適切な薬学的担体とを含む、組成物。

【請求項29】

免疫抑制性または免疫調節性の化合物または作用物質をさらに含む、請求項28記載の組成物。

【請求項30】

請求項1～22のいずれか一項記載のCD154結合抗体またはその抗原結合断片を含む、CD40シグナル伝達によって全部または一部が媒介されるヒトの容態、障害、もしくは疾患、または前記のもののいずれかの症状を処置または予防するための組成物。 40

【請求項31】

容態、障害、または疾患が、炎症もしくは自己免疫応答、または、線維症である、請求項30記載の組成物。

【請求項32】

炎症もしくは自己免疫応答、または線維症が、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、脊椎関節炎、炎症性腸疾患、クローン病、乾癬、多発性硬化症より選択される、請求項31記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】 50

【 0 0 0 1 】

本出願は、2007年3月27日に出願された米国特許仮出願第60/920,495号、2007年3月22日に出願された米国特許仮出願第60/919,938号、および2007年3月22日に出願された米国特許仮出願第60/919,816号からの優先権を主張する。US 60/920,495、US 60/919,938、およびUS 60/919,816の内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 0 0 2 】

発明の技術分野

本発明は、CD154(CD40L)タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質であって、抗体、抗体誘導体、および抗体断片を含む結合タンパク質を提供する。本発明はまた、ヒト化Fab断片が特異的に結合するエピトープに特異的に結合するキメラ抗体、ヒト化抗体、もしくは完全ヒト抗体、抗体誘導体、または抗体断片も提供し、前記ヒト化Fab断片は、SEQ ID NO: 1に記載の重鎖可変配列を含み、かつSEQ ID NO: 2に記載の軽鎖可変配列を含む。本発明のCD154結合タンパク質は、第2の抗CD154抗体と比べて低いエフェクター機能を引き出し得る。本発明のCD154結合タンパク質は、診断方法および治療方法において、例えば、CD154-CD40相互作用によって媒介される望ましくない免疫応答を伴うものを含む疾患の処置および予防において、有用である。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

発明の背景

体液性免疫および細胞性免疫の発生は、活性化されたヘルパーT細胞と抗原提示細胞(「APC」)およびエフェクターT細胞との相互作用によって調整される。ヘルパーT細胞の活性化は、抗原特異的なT細胞レセプター(「TCR」)とその同族ペプチド-MHCリガンドの相互作用に依存しているだけでなく、いくつかの細胞接着分子および共刺激分子による協調的な結合および活性化も必要とする。例えば、Salazar-Fontana, L. I.およびB. E. Bierer (2001) Curr. Opin. Hemat.8:5(非特許文献1)を参照されたい。

20

【 0 0 0 4 】

1つの決定的に重要な共刺激分子はCD154であり、これは、活性化に依存し、時間的に制限された様式でCD4⁺ T細胞の表面に発現されるII型膜貫通型タンパク質である。また、CD154は、活性化後、CD8⁺T細胞、好塩基球、肥満細胞、好酸球、ナチュラルキラー細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、および血小板の一部でも発現される。CD154のカウンターレセプターであるCD40はAPCを含む多くの細胞型の表面上で構成的かつ広範に発現されるI型膜タンパク質である。例えば、Foy, T. M. et al. (1996) Ann. Rev. Immunol.14:591(非特許文献2)を参照されたい。

30

【 0 0 0 5 】

CD40を介したCD154によるシグナル伝達により、CD40レセプターを有する細胞の活性化および最適なCD4⁺T細胞プライミングをもたらす事象のカスケードが開始する。より具体的には、CD40にCD154が結合することにより、B細胞の抗体分泌細胞およびメモリーB細胞への分化が促進される。例えば、Burkly, L. C. (2001) Adv. Exp. Med. Bio., 第489巻 D. M. Monroe et al. 編 Kluwer Academic/Plenum Publishers, 135頁(非特許文献3)(以下、「Burkly、前記」)を参照されたい。さらに、CD154-CD40相互作用は、マクロファージおよび樹状細胞の活性化ならびにナチュラルキラー細胞および細胞障害性Tリンパ球の発生を通じて、細胞性免疫を促進する。例えば、Burkly、同書(非特許文献3)を参照されたい。

40

【 0 0 0 6 】

体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方の機能を調節する際にCD154が中心的な役割を果たすことから、治療的免疫調節のためにこの経路の阻害物質を使用することに大きな関心が持たれるようになった。したがって、抗CD154抗体が、他の治療用タンパク質または遺伝子療法、アレルゲン、自己免疫、および移植に対する免疫応答の多種多様のモデルにおいて有益であることが示されている。例えば、US 5,474,771(特許文献1);Burkly、前記(非特許文献3)を参照されたい。

50

【 0 0 0 7 】

CD40-CD154相互作用は、実験的に誘導されるいくつかの自己免疫疾患において重要であることが示されており、疾患誘導は抗原投与時にCD154拮抗物質で阻止され得ることが示されている(Burkly、前記(非特許文献3))。また、抗CD154拮抗物質を用いた疾患の妨害は、自然発生自己免疫疾患の動物モデルにおいても認められている。例えば、Burkly、前記(非特許文献3)を参照されたい。

【 0 0 0 8 】

結合親和性がより高く、望まれない副作用のより少ない、改善された抗CD154抗体が現在必要とされている。直接的細胞障害、補体依存性細胞障害(「CDC」)、抗体依存性細胞障害(「ADCC」)、および異常な抗体産生などの高い「エフェクター機能」は、治療的抗体と関連している可能性がある望まれない副作用である。

10

【 0 0 0 9 】

いくつかの抗体エフェクター機能は、典型的な免疫グロブリンの定常ドメイン中の抗体のFc領域に結合するFcレセプター(FcR)によって少なくとも部分的に媒介される。様々なクラスの免疫グロブリンに特異的であるいくつかのFcレセプターがある。免疫グロブリンのクラスには、IgG、IgE、IgA、IgM、およびIgDが含まれる。免疫グロブリンのクラスは、さらにサブクラスに分類される：IgGは4つのサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4)に分類され、IgAは2つのサブクラス(IgA1およびIgA2)に分類される。IgGには3種類の公知のレセプターがある：Fc RI(CD64)、Fc RII(CD32)、およびFc RIII(CD16))。各Fc Rサブクラスは、2つまたは3つの遺伝子にコードされ、選択的なRNAスプライシングにより、多様な転写物およびFc Rアイソフォームの幅広い多様性がもたらされる。

20

【 0 0 1 0 】

典型的には、免疫グロブリンは、2つの同一な重鎖および2つの同一な軽鎖を含むY字型分子である。ジスルフィド結合が、重鎖および軽鎖のペア、ならびに2つの重鎖を連結する。各鎖は、配列が異なり、抗原結合を担っている1つの可変ドメインからなる。これらのドメインは、それぞれ、重鎖および軽鎖のV_HドメインおよびV_Lドメインとして公知である。軽鎖中には単一の定常ドメイン(C_L)があり、重鎖中には3つの定常ドメイン(C_{H1}、C_{H2}、およびC_{H3})がある。可変ドメインおよび定常ドメインのすべてを含む分子は、全抗体と呼ばれる場合がある。

【 0 0 1 1 】

抗体可変ドメイン中の残基は、Kabat et al.によって考案された方式に従って、慣例的に番号をつけられている。この方式は、Kabat et al., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA(非特許文献4)(以下、「Kabat et al.、前記」)において説明されている。別段の指示が無い限り、この番号付与方式が本明細書において使用される。Kabatの残基記号表示が、アミノ酸残基の直線的な番号付与と常に直接対応するとは限らないことに留意すべきである。実際の直線的アミノ酸配列の方が、基本的な可変ドメイン構造の構造的構成要素(フレームワークまたは相補性決定領域(CDR))の短縮またはそれらへの挿入に対応する厳密なKabatの番号付与の場合よりも少ないアミノ酸または付加的なアミノ酸を含む場合がある。残基の正確なKabatの番号付与は、ある所与の抗体に関して、その抗体の配列中の相同な残基を「標準」のKabat番号付与配列とアライメントすることによって決定することができる。

30

40

【 0 0 1 2 】

可変ドメイン内には3つの領域があり、これらは超可変性であり、より高度に保存された4つのフレームワーク領域内に順に配置されている。これらの超可変CDRは、抗原認識を主に担う。重鎖可変ドメインのCDRは、Kabatの番号付与方式によれば、残基31~35(CDR-H1)、残基50~65(CDR-H2)、および残基95~102(CDR-H3)に位置している。しかしながら、Chothiaによれば(Chothia, C.およびLesk, A.M. J. Mol. Biol., 1987, 196:901-917(非特許文献5))、CDR-H1に相当するループは、残基26~残基32に及ぶ。したがって、「CDR-H1」は、本明細書において使用される場合、Kabatの番号付与方式およびChothiaの位相幾何

50

学的ループ定義の組合せによって説明されるように、残基26～残基35に位置するCDRも含む。軽鎖可変ドメインのCDRは、Kabatの番号付与方式によれば、残基24～34(CDR-L1)、残基50～56(CDR-L2)、および残基89～97(CDR-L3)に位置している。

【0013】

全抗体または特異的結合特性を保持している断片として天然に存在する抗体は、もともとは単一の種に由来していたが、人工的に作り出された抗体、例えばキメラ抗体は、複数の動物種に由来してよい。これまで、マウス(マウスの)/ヒトキメラ抗体およびマウス/非ヒト霊長類抗体が主として作製されているが、他の混成種の組合せも可能である。天然に存在する抗体ポリペプチドおよび人工的に作り出された抗体ポリペプチド、ならびにそれらの誘導体および断片の多くの様々な構造が現在公知である。すべてに共通する特徴は、1つまたは複数のポリペプチドが、1つまたは複数のエピトープ結合ドメインを介して抗原結合特異性を保持しているということである。エピトープ結合は別にして、抗体ポリペプチドの機能特性は、どのような他の配列(例えば、エフェクター機能を活性化し、かつ/または他の細胞経路と相互に作用するFcドメインまたは他の配列)が存在するかによって異なる場合がある。

10

【0014】

非免疫グロブリンの骨格またはフレームワーク中に組み入れられたエピトープ結合ドメイン(CDRまたは可変ドメインなど)を含むCD154結合タンパク質(例えば、Binz et al. 2005 Nat Biotech 23:1257-1268(非特許文献6); Hosse et al. 2006 Protein Science 15:14-27(非特許文献7)を参照されたい)は、低いエフェクター機能を示す場合がある。CD40へのCD154の結合に特異的に拮抗し、CD154-CD40複合体の下流での機能を低下させるか、または排除する新しい結合タンパク質を得ることが望ましいと考えられる。また、公知の抗CD154抗体と比べて低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体のようなCD154結合タンパク質を得ることも望ましいと考えられる。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】US 5,474,771

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Salazar-Fontana, L. I.およびB. E. Bierer (2001) Curr. Opin. Hematol. 8:5

30

【非特許文献2】Foy, T. M. et al. (1996) Ann. Rev. Immunol. 14:591

【非特許文献3】Burkly, L. C. (2001) Adv. Exp. Med. Bio., 第489巻 D. M. Monroe et al. 編 Kluwer Academic/Plenum Publishers, 135頁

【非特許文献4】Kabat et al., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA

【非特許文献5】Chothia, C.およびLesk, A.M. J. Mol. Biol., 1987, 196:901-917

【非特許文献6】Binz et al. 2005 Nat Biotech 23:1257-1268

【非特許文献7】Hosse et al. 2006 Protein Science 15:14-27

40

【発明の概要】

【0017】

本発明は、ヒトCD154タンパク質でよいCD154タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質、例えば、単離された抗体、組換え抗体、もしくは合成抗体、またはそれらの断片もしくは誘導体を提供することによって、これらおよび他の問題の解決法を提供する。それらの断片および誘導体を含む本発明の抗CD154抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、マウス抗体、キメラ抗体、霊長類化抗体、ヒト化抗体、または完全ヒト抗体でよい。本発明の抗CD154抗体は、多量体、ヘテロ二量体、ヘミ二量体(hemidimeric)、一価、二価、四価、二重特異性でよく、単鎖抗体およびそれらの誘導体も含まれ得る。

【0018】

50

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、CD154に対して高い選択性を有し、また、いくつかの態様において、例えば、抗CD154抗体5c8(US 5,474,771において説明されているように、ATCCアクセッション番号HB10916で寄託されたハイブリドーマによって産生された;またはヒト化5c8)と比べて低い1つまたは複数のエフェクター機能も有する。本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体のうちいくつかは、CD154結合に関して一価である。

【 0 0 1 9 】

本発明のCD154結合タンパク質および抗CD154抗体(抗体断片および抗体誘導体を含む)は、CD40へのCD154の結合を阻害するのに有用であり、高い特異性で、例えば、20pM~1.5 μM(両端の数値を含む)の範囲のIC50でこれを行う。特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば、抗CD154抗体は、20pm~500pm、50pm~500pm、または100pm~500pmの範囲のIC50を有してよい。特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質および抗CD154抗体(抗体断片および抗体誘導体を含む)は、CD40活性を実質的に刺激(agonize)しない。

10

【 0 0 2 0 】

本発明の特定の態様は、ヒトCD154に対して高親和性を示すCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体に関する。例えば、特定の態様において、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、表面プラズモン共鳴(例えば、Biacore(登録商標))によって決定された場合、50nM~1pM(両端の数値を含む)の範囲のK_DでヒトCD154(ヒトCD40L)から解離する。例えば、ヒトCD154に対するK_Dは、50pm~1pm、20pm~1pm、またはさらに10pm~1pmでよい。いくつかの態様において、ヒトCD154に対するK_Dは、20pMより小さい。他の態様において、ヒトCD154に対するK_Dは、10pMより小さい。

20

【 0 0 2 1 】

特定の態様において、本発明は、その結合親和性に基づいたCD154結合の飽和濃度またはそれ以上で存在する場合に、最初にCD154に添加された場合にはCD154に対する抗体5c8の結合を阻止することができ、かつ抗体5c8をCD154に添加した後に添加された場合にはCD154に結合している抗体5c8と置き換わることもできる、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を提供する。

【 0 0 2 2 】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合し、かつ、CDR-H1(SEQ ID NO: 3)、CDR-H2(SEQ ID NO: 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 5)より選択される1つもしくは複数のCDR重鎖(H)配列を含むか、またはそれらからなる結合タンパク質、例えば抗体を提供する。さらなる態様において、CD154結合タンパク質または抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 3)、CDR-H2(SEQ ID NO: 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 5)より選択される少なくとも2つのCDRを含むか、またはそれらからなる。さらに別の態様において、結合タンパク質または抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 3)、CDR-H2(SEQ ID NO: 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 5)である3つのCDR H配列すべてを含むか、またはそれらからなる。

30

【 0 0 2 3 】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合し、かつ、CDR-L1(SEQ ID NO: 6)、CDR-L2(SEQ ID NO: 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 8)より選択される1つもしくは複数のCDR軽鎖(L)配列を含むか、またはそれらからなる結合タンパク質、例えば抗体を提供する。さらなる態様において、CD154結合タンパク質または抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 6)、CDR-L2(SEQ ID NO: 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 8)より選択される少なくとも2つのCDRを含むか、またはそれらからなる。さらに別の態様において、CD154結合タンパク質または抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 6)、CDR-L2(SEQ ID NO: 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 8)である3つのCDR L配列すべてを含むか、またはそれらからなる。

40

【 0 0 2 4 】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合し、かつ、CDR-L1(SEQ ID NO: 6)、CDR-L2(SEQ ID NO: 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 8)を含むか、またはそれらからなる結合タンパク質、例えば抗体を提供し、ここで、この結合タンパク質または

50

抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO : 3)、CDR-H2(SEQ ID NO : 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 5)をさらに含むか、またはそれらからなる。

【 0 0 2 5 】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質、例えば抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 10、およびSEQ ID NO : 11より選択されるV_H配列を含むか、またはそれらからなる。特定の他の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質、例えば抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 13より選択される重鎖配列を含むか、またはそれらからなる。

10

【 0 0 2 6 】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質、例えば抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 2およびSEQ ID NO : 14より選択されるV_L配列を含むか、またはそれらからなる。特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質、例えば抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列を含むか、またはそれらからなる。

【 0 0 2 7 】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質、例えば抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 2およびSEQ ID NO : 14より選択されるV_L配列ならびにSEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 10、およびSEQ ID NO : 11より選択されるV_H配列を含むか、またはそれらからなる。特定の他の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質、例えば抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列ならびにSEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 13より選択される重鎖配列を含むか、またはそれらからなる。他の態様において、CD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 13の重鎖配列を含むか、またはそれらからなる。

20

【 0 0 2 8 】

他の態様において、本発明は、CD154に特異的に結合し、かつ、CDR-H1(SEQ ID NO : 42)、CDR-H2(SEQ ID NO : 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 44)より選択される1つまたは複数の重鎖(H)CDR配列を含むか、またはそれらからなる結合タンパク質、例えば抗体に関する。さらなる態様において、結合タンパク質または抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO : 42)、CDR-H2(SEQ ID NO : 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 44)より選択される少なくとも2つのCDRを含むか、またはそれらからなる。さらに別の態様において、結合タンパク質または抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO : 42)、CDR-H2(SEQ ID NO : 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 44)である3つのCDR H配列すべてを含むか、またはそれらからなる。

30

【 0 0 2 9 】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する結合タンパク質、例えば抗体を提供し、ここで、この結合タンパク質または抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 45)、CDR-L2(SEQ ID NO : 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 47)より選択される1つまたは複数のCDR軽鎖(L)配列を含むか、またはそれらからなる。さらなる態様において、結合タンパク質または抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 45)、CDR-L2(SEQ ID NO : 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 47)より選択される少なくとも2つのCDRを含むか、またはそれらからなる。さらに別の態様において、結合タンパク質または抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 45)、CDR-L2(SEQ ID NO : 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 47)である3つのCDR L配列すべてを含むか、またはそれらからなる。

40

【 0 0 3 0 】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、上記のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3のうち1つもしくは複数の軽鎖CDRを含むか、もしくはそれらか

50

らなる相補的配列、または上記のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3のうち1つもしくは複数の重鎖CDRを含むか、もしくはそれらからなる相補的配列をそれぞれ含む。したがって、特定の態様において、本発明の結合タンパク質または抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 42)、CDR-H2(SEQ ID NO: 43)、またはCDR-H3(SEQ ID NO: 44)、およびCDR-L1(SEQ ID NO: 45)、CDR-L2(SEQ ID NO: 46)、またはCDR-L3(SEQ ID NO: 47)を含むか、またはそれらからなる。

【0031】

特定の態様において、本発明は、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を提供し、ここで、この結合タンパク質または抗体は、次の3つのCDR L配列：CDR-L1(SEQ ID NO: 45)、CDR-L2(SEQ ID NO: 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 47)を含むか、またはそれらからなり、かつ、この結合タンパク質または抗体は、次の3つのCDR H配列：CDR-H1(SEQ ID NO: 42)、CDR-H2(SEQ ID NO: 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 44)をさらに含むか、またはそれらからなる。

10

【0032】

さらなる態様において、本発明は、CD154に特異的に結合し、かつ、SEQ ID NO: 54の可変軽鎖(V_L)配列を含むか、またはそれらからなる結合タンパク質、例えば抗体を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO: 56の可変重鎖(V_H)配列を含むか、またはそれらからなるCD154結合タンパク質または抗CD154抗体にも関する。特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、SEQ ID NO: 54の V_L 配列およびSEQ ID NO: 56の V_H 配列の両方を含むか、またはそれらからなっておりよい。

20

【0033】

他の態様において、本発明は、CD154に特異的に結合するCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体に関し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 48)、CDR-H2(SEQ ID NO: 49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 50)より選択される1つまたは複数の重鎖(H)CDR配列を含むか、またはそれらからなる。さらなる態様において、CD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 48)、CDR-H2(SEQ ID NO: 49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 50)より選択される少なくとも2つのCDRを含むか、またはそれらからなる。さらに別の態様において、CD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、CDR-H1 (SEQ ID NO: 48)、CDR-H2 (SEQ ID NO: 49)、およびCDR-H3 (SEQ ID NO: 50)である3つのCDR H配列すべてを含むか、またはそれらからなる。

30

【0034】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合するCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 51)、CDR-L2(SEQ ID NO: 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 53)より選択される1つまたは複数のCDR軽鎖(L)配列を含むか、またはそれらからなる。さらなる態様において、CD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 51)、CDR-L2(SEQ ID NO: 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 53)より選択される少なくとも2つのCDRを含むか、またはそれらからなる。さらに別の態様において、CD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 51)、CDR-L2(SEQ ID NO: 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 53)である3つのCDR L配列すべてを含むか、またはそれらからなる。

40

【0035】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、上記のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3のうち1つもしくは複数の軽鎖CDRを含むか、もしくはそれらからなる相補的配列、または上記のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3のうち1つもしくは複数の重鎖CDRを含むか、もしくはそれらからなる相補的配列をそれぞれ含む。したがって、特定の態様において、本発明の抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 48)、CDR-H2(SEQ ID NO: 49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 50)より選択されるCDR H、またはCDR-L1(SEQ ID NO: 51)、CDR-L2(SEQ ID NO: 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 53)より選択されるCDR Lを含むか、またはそれらからなる。

【0036】

50

特定の態様において、本発明は、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 51)、CDR-L2(SEQ ID NO: 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 53)である3つのCDR L配列すべてを含むか、またはそれらからなり、かつ、この結合タンパク質、例えば抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 48)、CDR-H2(SEQ ID NO: 49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 50)である3つのCDR H配列すべてをさらに含むか、またはそれらからなる。

【0037】

さらなる態様において、本発明は、CD154に特異的に結合するCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を提供し、ここで、このCD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、SEQ ID NO: 58のV_L配列を含むか、またはそれらからなる。さらなる態様において、抗体は、SEQ ID NO: 60のV_H配列を含むか、またはそれらからなる。さらなる態様において、抗体は、SEQ ID NO: 60のV_H配列およびSEQ ID NO: 58のV_L配列を含むか、またはそれらからなる。

10

【0038】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、SEQ ID NO: 62に記載の軽鎖配列およびSEQ ID NO: 65に記載の重鎖配列を含む。他の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、SEQ ID NO: 63に記載の軽鎖配列およびSEQ ID NO: 66に記載の重鎖配列を含む。

【0039】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、SEQ ID NO: 68に記載の軽鎖配列およびSEQ ID NO: 71に記載の重鎖配列を含む。他の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、SEQ ID NO: 69に記載の軽鎖配列およびSEQ ID NO: 72に記載の重鎖配列を含む。他の態様において、CD154結合タンパク質は、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 71、およびSEQ ID NO: 72に記載の配列のうち少なくとも1つを含む。

20

【0040】

SEQ ID NO: 3~8のCDR配列は、ラットモノクローナル抗体342に由来する。本発明の代替の態様において、抗CD154抗体は、SEQ ID NO: 29のV_Hドメイン配列およびSEQ ID NO: 30のV_Lドメイン配列を含むラット342抗体である。本発明はまた、SEQ ID NO: 31およびSEQ ID NO: 32より選択される少なくとも1つの配列を含むか、またはそれらからなる、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、または合成DNA分子も提供する。さらに、SEQ ID NO: 33およびSEQ ID NO: 34より選択される少なくとも1つの配列を含むベクターも提供される。

30

【0041】

本発明はまた、本明細書において開示する抗CD154抗体のいずれか1つが結合するのと同じエピトープに選択的に結合するCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体(例えば、342抗体、381抗体、および338抗体ならびにそれらのエピトープ結合配列)も提供する。特に、本発明の抗体342および抗体338は、本明細書において説明するように、抗CD154抗体5c8を用いた競合アッセイ法において第1の抗体または第2の抗体として使用した場合に、同様のCD154結合特性を示す。

【0042】

したがって、特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 12またはSEQ ID NO: 13に記載の重鎖配列を含み、かつSEQ ID NO: 15に記載の軽鎖配列を含む(342のFab断片およびFab'断片を含む)ヒト化抗体が結合するのと同じエピトープに結合し、かつ、本明細書において説明するように、抗CD154抗体5c8を用いた競合アッセイ法において第1の抗体または第2の抗体として使用した場合に、同様のCD154結合特性を示すCD154結合タンパク質および抗CD154抗体を提供する。他の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 58に記載のV_Lドメイン配列を含み、かつSEQ ID NO: 60に記載のV_Hドメイン配列を含む(338抗体の可変配列を含む)ヒト化抗体が結合するのと同じエピトープに結合し、かつ、本明細書において説明するように、抗CD154抗体5c8を用いた競合アッセイ法において同様のCD154結合特性を示すCD154結合タンパク質および抗CD154抗体を提供する。

40

【0043】

本発明のCD154結合タンパク質に関する上記の態様のいずれかにおいて、結合タンパク

50

質はペグ化されてよい。CD154結合タンパク質が抗CD154抗体、抗体ポリペプチド、またはその断片もしくは誘導体である態様において、抗体の重鎖、軽鎖、または両方の鎖がペグ化されてよい。

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、SEQ ID NO : 16、SEQ ID NO : 17、SEQ ID NO : 18、およびSEQ ID NO : 25より選択される少なくとも1つの配列を含むか、またはそれらからなる、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子も提供する。

【 0 0 4 5 】

特定の態様において、本発明はまた、

SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21,

10

SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO:

27, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 70 および SEQ ID NO: 73

より選択される少なくとも1つの配列を含むか、またはそれらからなる、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子も提供する。

【 0 0 4 6 】

他の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 28およびSEQ ID NO : 41より選択される少なくとも1つの配列を含むか、またはそれらからなる、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子を提供する。

【 0 0 4 7 】

20

本発明はまた、本発明の単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子のいずれか1つを含むベクターも提供する。1つの態様において、ベクターは、SEQ ID NO : 25、SEQ ID NO : 26、SEQ ID NO : 27、SEQ ID NO : 28、およびSEQ ID NO : 41より選択される少なくとも1つの配列を含む。

【 0 0 4 8 】

さらなる態様において、本発明は、SEQ ID NO : 55およびSEQ ID NO : 57より選択される少なくとも1つの配列を含むか、またはそれらからなる、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子を提供する。いくつかの態様において、本発明は、SEQ ID NO : 55およびSEQ ID NO : 57の両方を含むか、またはそれらからなる、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子を提供する。

30

【 0 0 4 9 】

さらなる態様において、本発明は、SEQ ID NO : 59およびSEQ ID NO : 61より選択される少なくとも1つの配列を含むか、またはそれらからなる、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子を提供する。いくつかの態様において、本発明は、SEQ ID NO : 59およびSEQ ID NO : 61の両方を含むか、またはそれらからなる、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子を提供する。

【 0 0 5 0 】

エフェクター機能に寄与する配列を含むCD154結合タンパク質および抗CD154抗体に関する本発明の態様のいずれかにおいて、該結合タンパク質または抗CD154抗体は、本明細書の別の箇所で説明するように、Fc領域を有する抗CD154抗体と比べて低いエフェクター機能を引き出すように、さらに選択または操作されてよい。例えば、Fc領域配列も定常領域配列も含まないか、または機能的なFc領域配列もしくは定常領域配列を欠いているCD154結合タンパク質および抗CD154抗体を、本発明において使用するために選択してよい。

40

【 0 0 5 1 】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質および抗CD154抗体は、CD154への結合に関して一価であり、好ましくは、対象に投与された場合に、二価の抗CD154抗体のような比較可能なCD154結合タンパク質と比べて低いエフェクター機能を引き出す。

【 0 0 5 2 】

他の特定の態様において、Fc領域配列または定常領域配列は、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体ポリペプチド中に存在する場合には、天然、親、または未修飾のFc領

50

域配列または定常領域配列を含む対照抗CD154抗体と比べて、1つまたは複数のエフェクター機能を低下または排除する1つまたは複数の修飾(例えば、アミノ酸の置換、挿入、付加物、または欠失)を含むように選択または操作されてよい。

【0053】

本発明のいくつかの態様において、Fc領域は、存在する場合、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、もしくはIgG4抗体のFc領域であるか、またはそれらに由来する。いくつかの態様において、ハイブリッドFc領域、すなわち、IgG1/IgG4ハイブリッドFc配列が使用され得る。特定の態様において、Fc領域は、IgG4 Fc配列を含むか、またはIgG4抗体に由来する。1つまたは複数のエフェクター機能を低下させる、様々なFc領域の任意のハイブリッド組合せが本発明によって使用され得ることを理解すべきである。

10

【0054】

他の特定の態様において、本明細書においてさらに説明するように、抗体のFc部分のグリコシル化が減少させられるか、もしくは排除されるか、または抗体のグリコシル化プロファイルが改変される。特定の態様において、CD154結合タンパク質または抗CD154抗体ポリペプチドは、保存されたN結合型グリコシル化部位またはその近くに修飾を有するFc領域を有するC_{H2}ドメインを含む。保存されたN結合型グリコシル化部位の修飾は、重鎖グリコシル化部位中またはその近くに変異を含んでよく、この変異は、その部位でのグリコシル化を低減、改変、または妨害する。さらなる態様において、修飾は、変異N298Q(EU Kabat番号付与を用いるとN297)を含む。特定の態様において、修飾は、C_{H2}ドメイングリカンまたはその一部分の除去を含む。特定の代替態様において、修飾は、グリコシル化部位での成熟したN-グリカンの形成を妨害する。

20

【0055】

いくつかの態様において、本発明は、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 44、およびSEQ ID NO : 50より選択される重鎖CDR3配列ならびに変種Fc領域を含むCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体に関し、この変種Fc領域は第1のアミノ酸残基およびN-グリコシル化部位を含み、この第1のアミノ酸残基は、側鎖化学反応またはアミノ酸置換によって修飾されて、未修飾の第1のアミノ酸残基と比べて増大した立体容積または増加した静電荷を実現し、それによって、N-グリコシル化部位でのグリコシル化のレベルを低下させるか、またはそうでなければグリコシル化を改変する。これらの態様のうちいくつかにおいて、変種Fc領域は、対照の非変種Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える。

30

【0056】

特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 44、およびSEQ ID NO : 50より選択される重鎖CDR3配列ならびに変種Fc領域を含むCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体に関し、この変種Fc領域は第1のアミノ酸残基およびN-グリコシル化部位を含み、この第1のアミノ酸残基はシステインチオールを含み、それによって、N-グリコシル化部位でのグリコシル化のレベルを低下させるか、またはグリコシル化を改変し、ここで、変種Fc領域は低いエフェクター機能を与える。

【0057】

特定の態様において、前述の変種Fc領域を含む抗CD154抗体の第1のアミノ酸残基およびN-グリコシル化部位は、N結合型グリコシル化モチーフの近くまたはその内部にある。さらなる態様において、N結合型グリコシル化モチーフは、アミノ酸配列NXTまたはNXSを含む。特定の態様において、N結合型グリコシル化モチーフは、アミノ酸配列NXTを含む。特定の態様において、N-グリコシル化部位は、Kabatの番号付与方式によれば、アミノ酸297番に位置する。さらなる態様において、修飾された第1のアミノ酸残基は、Kabatの番号付与方式によれば、アミノ酸299番である。

40

【0058】

上記の態様のいくつかにおいて、本明細書において説明する結合タンパク質を含む抗体または抗体断片のいずれか1つによって示される低いエフェクター機能は、Fcレセプター(FcR)への減少した結合である。特定の態様において、Fcレセプター(FcR)は、Fc RI、Fc RII、およびFc RIII、ならびに、例えばFc RIIaのようなそれらの1つまたは複数のサ

50

ブタイプより選択される。いくつかの態様において、FcR結合は、少なくとも約1.5分の1もしくはそれ以下、約2分の1もしくはそれ以下、約3分の1もしくはそれ以下、約4分の1もしくはそれ以下、約5分の1もしくはそれ以下、約6分の1もしくはそれ以下、約7分の1もしくはそれ以下、約8分の1もしくはそれ以下、約9分の1もしくはそれ以下、約10分の1もしくはそれ以下、約15分の1もしくはそれ以下、約50分の1もしくはそれ以下、または約100分の1もしくはそれ以下に減少する。

【0059】

特定の態様において、本明細書において説明する1つまたは複数の低いエフェクター機能を有する本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、特異的なエフェクターレセプターにもエフェクターレセプターのサブタイプにも結合しない。これらの態様のうちいくつかにおいて、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、Fc RIIaに結合しない。

10

【0060】

特定の態様において、本明細書において説明する抗体のいずれか1つによって示される低いエフェクター機能は、補体タンパク質への減少した結合である。いくつかの態様において、補体タンパク質はC1qである。特定の態様において、補体タンパク質への減少した結合は、約1.5分の1もしくはそれ以下、約2分の1もしくはそれ以下、約3分の1もしくはそれ以下、約4分の1もしくはそれ以下、約5分の1もしくはそれ以下、約6分の1もしくはそれ以下、約7分の1もしくはそれ以下、約8分の1もしくはそれ以下、約9分の1もしくはそれ以下、約10分の1もしくはそれ以下、または約15分の1もしくはそれ以下である。

20

【0061】

本発明のさらなる態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、Fc領域中に1つまたは複数の修飾または変化を含み、グリコシル化されておらず、かつ、対象に投与された場合に1つまたは複数の低いエフェクター機能を引き出す。

【0062】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、対象に投与された場合に、抗CD154抗体5c8の投与が引き起こすよりも少ない血栓塞栓性作用を引き起こす。

【0063】

本発明の特定の態様において、前述の変種Fc領域を含むCD154結合タンパク質または抗CD154抗体の修飾された第1のアミノ酸残基は、機能的部分に連結されている。さらなる態様において、機能的部分は、ブロッキング部分、検出可能部分、診断的部分、もしくは治療的部分、またはそれらの組合せである。特定の態様において、ブロッキング部分は、例えば、システイン付加物、混合ジスルフィド、ポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコールマレイミドでよい。特定の態様において、検出可能部分は、例えば、蛍光性部分、発光性部分、または同位体部分でよい。診断的部分が使用される態様において、診断的部分は、容態、疾患、または障害の存在を明らかにすることができる場合がある。他の態様において、治療的部分、例えば、抗炎症剤、抗癌剤、抗神経変性剤、CD154以外の分子に対して選択的である抗体、または抗感染剤などを使用してよい。

30

【0064】

本発明の特定の態様において、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、修飾されたアミノ酸残基を含み、この修飾により、部位特異的ペグ化のためのような、機能的部分へのタンパク質または抗体の部位特異的結合が可能になる。特定の態様において、修飾されたアミノ酸残基は、システインまたは混合ジスルフィドの付加物によって修飾されたシステイン残基である。したがって、特定の態様において、CD154結合タンパク質は、修飾されたアミノ酸残基、例えば、システイン残基またはリジン残基においてペグ化されている抗CD154抗体ポリペプチドである。特定の態様において、抗CD154抗体は、PEG-マレイミドでペグ化されたFab断片またはFab'断片である。

40

【0065】

本発明はまた、核酸、例えば、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体をコ

50

ードするDNA配列も提供する。本発明のDNA配列は、例えば、化学的処理によって作製される合成DNA、cDNA、ゲノムDNA、またはそれらの任意の組合せを含んでよい。本発明はさらに、本発明の1つまたは複数の核酸、例えばDNA配列を含むクローニングベクターまたは発現ベクターも提供する。本発明はまた、いくつかの態様において、前述の合成核酸、単離された核酸、および/または組換え核酸のいずれかを含むベクターにも関する。

【0066】

本発明はまた、本発明のDNA配列またはベクターを含む宿主細胞を提供する。特定の局面において、本発明は、宿主細胞にCD154結合タンパク質または抗CD154抗体を産生させるのに適した条件下で、前述のベクターのいずれかを含む宿主細胞を培養する段階を含む、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を産生させるための方法に関する。いくつかの態様において、この方法は、宿主細胞培養物からCD154結合タンパク質または抗CD154抗体を回収する段階を含む。

10

【0067】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質、抗CD154抗体、または核酸は、放射性同位体、酵素、色素、またはビオチンでよい検出可能マーカーで標識される。他の特定の態様において、本発明の抗体は、例えば、ラジオアイソトープ、放射性核種、毒素、トキシイド、CD154以外に特異的な抗体ポリペプチドまたは断片(すなわち、二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体を作製する)、または化学療法剤でよい、少なくとも1つの他の治療物質に結合される。さらに別の態様において、本発明の抗体は、標識部分であり得る造影剤に結合される。標識物質はまた、ビオチン、蛍光性部分もしくは発光性部分、放射性部分、ヒスチジンタグ、またはペプチドタグでよい。

20

【0068】

本発明はまた、本明細書において説明するCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体の配列変種、およびそれらをコードする核酸配列にも関する。本発明の配列変種は、好ましくは、本発明のポリペプチドまたはそれをコードする核酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、または94%の同一性を共有する。より好ましくは、配列変種は、アミノ酸レベルまたは核酸レベルで、少なくとも95%、96%、97%、または98%の同一性を共有する。最も好ましくは、配列変種は、本発明のポリペプチドまたはそれをコードする核酸配列と少なくとも99%、99.5%、99.9%、またはそれ以上の同一性を共有する。

【0069】

したがって、本発明は、
SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID
NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO:
9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:
14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO:
42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO:
47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO:
52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO:
60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 または SEQ ID NO: 72
の配列に少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、または100%同一である配列を含む、単離されたタンパク質を提供する。

30

40

【0070】

特定の態様において、本発明のキメラ抗CD154抗体ポリペプチド、ヒト化抗CD154抗体ポリペプチド、またはヒト抗CD154抗体ポリペプチドは、例えば、dAb、Fab、Fab'、scFv、Fv、ジスルフィド結合されたFvであるか、またはCD154結合に関して特異的かつ一価である、V_HドメインまたはV_Lドメインのような単一の免疫グロブリン可変ドメインを含む。本発明のある種のCD154結合タンパク質、例えば、キメラ抗CD154抗体ポリペプチド、ヒト化抗

50

CD154抗体ポリペプチド、またはヒト抗CD154抗体ポリペプチドは、本発明の1つ、2つ、またはそれ以上のCDRおよび代替の骨格配列または普遍的な(universal)フレームワーク配列を含む。特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質および抗CD154抗体は、可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)より選択される単一の可変ドメインを含む。

【0071】

本発明はまた、CD154への結合に関して一価であり、機能的部分を欠く同じポリペプチドと比べてインビボでのその半減期を延長する機能的部分に結合しているCD154結合タンパク質、例えば、キメラ抗CD154抗体ポリペプチド、ヒト化抗CD154抗体ポリペプチド、またはヒト抗CD154抗体ポリペプチドも提供する。特定の態様において、機能的部分は、ポリエチレングリコールを含むか、またはそれからなる。特定の態様において、機能的部分は、ヒト血清アルブミンのようなアルブミン分子を含むか、またはそれからなる。したがって、本発明は、CD154に特異的かつ一価的に結合し、かつ、結合されたポリエチレングリコールを欠く同じポリペプチドと比べてインビボでの半減期が長い、PEG結合CD154結合タンパク質、例えば、PEG結合キメラ抗CD154抗体ポリペプチド、ヒト化抗CD154抗体ポリペプチド、またはヒト抗CD154抗体ポリペプチドを提供する。

10

【0072】

本発明はまた、少なくとも1つの本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を含み、いくつかの態様において、薬学的に許容される担体をさらに含んでよい、薬学的組成物も提供する。本発明の薬学的組成物は、任意で、例えば、免疫抑制性もしくは免疫調節性の化合物もしくは作用物質;または診断用物質などの付加的な生物活性物質または治療物質をさらに含んでよい。特定の態様において、組成物は、本明細書において説明するように、抗CD154抗体342または338のエピトープ特異性を有するペグ化された抗CD154 Fab'抗体の治療的有効量を含む。

20

【0073】

本発明はさらに、CD40シグナル伝達によって全部または一部が媒介されるヒトの容態、障害、疾患、または前記のものいずれかの症状を処置または予防するための方法であって、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を含む薬学的組成物の治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含み、その結果、容態、疾患、または障害の療法または予防が実現される方法を提供する。

【0074】

本発明はまた、CD40シグナル伝達によって全部または一部が媒介される1つもしくは複数の免疫応答、自己免疫応答、もしくは炎症応答、または前記のものいずれかの症状を抑制または予防するための方法であって、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を含む薬学的組成物の治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含み、その結果、治療的応答または予防的応答が実現される方法も提供する。特定の態様において、この方法は、全身性エリテマトーデス(SLE)の徴候を提示しているか、またはそれと診断された対象を処置するのに使用される。他の態様において、この方法は、例えば関節リウマチ(RA)のようなリウマチ性容態の徴候を提示しているか、またはそれと診断された対象を処置するのに使用される。

30

【0075】

本発明は、CD154への結合に関して一価であるヒト抗体ポリペプチドを提供する。特定の態様において、CD154への結合に関して一価であるヒト抗体ポリペプチドは、その結合親和性に基づいたCD154結合の飽和濃度またはそれ以上で存在する場合に、最初にCD154に添加された場合にはCD154に対する抗体5c8の結合を阻止し、かつまた、抗体5c8を添加した後に添加された場合にはCD154に結合している抗体5c8と置き換わる。特定の態様において、ヒト抗体ポリペプチドは、PEG結合されている。特定の態様において、ヒト抗体ポリペプチドは、Fcドメインを含まない。上記の態様のいくつかにおいて、CD154結合タンパク質またはヒト抗体ポリペプチドは、CD40に結合しているCD154とは置き換わらない。

40

【0076】

特定の態様において、本発明は、CD154への結合に関して一価であるペグ化された抗CD1

50

54 Fab'抗体を提供し、さらに、関節リウマチのような関節炎または全身性エリテマトーデス(SLE)の1つまたは複数の症状を処置または予防するための方法であって、ペグ化された抗CD154 Fab'抗体を含む薬学的組成物の治療的有効量を、それを必要とする対象に投与する段階を含み、その結果、治療的応答または予防的応答が実現される方法も提供する。

[請求項101]

CDR-H1(SEQ ID NO:3)、CDR-H2(SEQ ID NO:4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO:5)より選択される1つまたは複数の重鎖CDR配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項102]

CDR-L1(SEQ ID NO:6)、CDR-L2(SEQ ID NO:7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO:8)より選択される1つまたは複数の軽鎖CDR配列を含む、CD154結合タンパク質。

10

[請求項103]

3つの重鎖CDR配列すべてを含む、請求項101記載のCD154結合タンパク質。

[請求項104]

3つの軽鎖CDR配列すべてを含む、請求項102記載のCD154結合タンパク質。

[請求項105]

3つの軽鎖CDR配列すべておよび3つの重鎖CDR配列すべてを含む、請求項101または請求項102記載のCD154結合タンパク質。

[請求項106]

SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、およびSEQ ID NO:11より選択されるV_H配列を含む、CD154結合タンパク質。

20

[請求項107]

SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:14より選択されるV_L配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項108]

SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:14より選択されるV_L配列を含み、かつ、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、およびSEQ ID NO:11より選択されるV_H配列をさらに含む、CD154結合タンパク質。

[請求項109]

SEQ ID NO:29のV_H配列およびSEQ ID NO:30のV_L配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項110]

SEQ ID NO:15の軽鎖配列と、SEQ ID NO:12およびSEQ ID NO:13より選択される重鎖配列とを含む、CD154結合タンパク質。

30

[請求項111]

重鎖配列がSEQ ID NO:13である、請求項110記載のCD154結合タンパク質。

[請求項112]

ペグ化されている、請求項110または111記載のCD154結合タンパク質。

[請求項113]

SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ

ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23,

SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 31 および SEQ ID NO: 32

より選択される配列を含む、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、または合成DNA分子。

40

[請求項114]

SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:33、およびSEQ ID NO:34より選択される配列を含む、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、または合成DNA分子。

[請求項115]

SEQ ID NO:28またはSEQ ID NO:41に示される配列を含む、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、または合成DNA分子。

[請求項116]

CDR-H1(SEQ ID NO:42)、CDR-H2(SEQ ID NO:43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO:44)より選択

50

される1つまたは複数の重鎖CDR配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項117]

CDR-L1(SEQ ID NO:45)、CDR-L2(SEQ ID NO:46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO:47)より選択される1つまたは複数の軽鎖CDR配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項118]

3つの重鎖CDR配列すべてを含む、請求項116記載のCD154結合タンパク質。

[請求項119]

3つの軽鎖CDR配列すべてを含む、請求項117記載のCD154結合タンパク質。

[請求項120]

3つの軽鎖CDR配列すべておよび3つの重鎖CDR配列すべてを含む、請求項116または請求項117記載のCD154結合タンパク質。

10

[請求項121]

CDR-H1(SEQ ID NO:48)、CDR-H2(SEQ ID NO:49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO:50)より選択される1つまたは複数の重鎖CDR配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項122]

CDR-L1(SEQ ID NO:51)、CDR-L2(SEQ ID NO:52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO:53)より選択される1つまたは複数の軽鎖CDR配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項123]

3つの重鎖CDR配列すべてを含む、請求項121記載のCD154結合タンパク質。

[請求項124]

3つの軽鎖CDR配列すべてを含む、請求項122記載のCD154結合タンパク質。

20

[請求項125]

3つの軽鎖CDR配列すべておよび3つの重鎖CDR配列すべてを含む、請求項121または請求項122記載のCD154結合タンパク質。

[請求項126]

SEQ ID NO:56のV_H配列およびSEQ ID NO:54のV_L配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項127]

SEQ ID NO:58のV_H配列およびSEQ ID NO:60のV_L配列を含む、CD154結合タンパク質。

[請求項128]

SEQ ID NO:55に示される配列およびSEQ ID NO:57に示される配列を含む、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、または合成DNA分子。

30

[請求項129]

SEQ ID NO:59に示される配列およびSEQ ID NO:61に示される配列を含む、単離されたDNA分子、組換えDNA分子、または合成DNA分子。

[請求項130]

請求項113～115、128、および129のいずれか一項記載の単離されたDNA分子、組換えDNA分子、または合成DNA分子を含む、ベクター。

[請求項131]

請求項130記載のベクターを含む、宿主細胞。

[請求項132]

免疫グロブリンFc領域を欠く、請求項101、116、および121のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

40

[請求項133]

IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、またはIgG4抗体より選択されるFc領域を含む、請求項101、116、および121のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項134]

Fc領域が、IgG4 Fc配列を含むか、またはIgG4抗体に由来する、請求項133記載のCD154結合タンパク質。

[請求項135]

天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに

50

含む、請求項101、116、および121のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項136]

変種Fc領域が、複数のIg Fcドメインタイプに由来する配列を含むハイブリッドFc領域である、請求項135記載のCD154結合タンパク質。

[請求項137]

IgG1/IgG4ハイブリッドFc配列を含む、請求項135記載のCD154結合タンパク質。

[請求項138]

抗体のFc部分のC_H2ドメイン中の保存されたN結合型グリコシル化部位に修飾をさらに含む、請求項101、116、および121のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項139]

修飾が重鎖グリコシル化部位中またはその近くに変異を含み、該変異が、該部位でのグリコシル化を低減、改変、または妨害する、請求項138記載のCD154結合タンパク質。

[請求項140]

SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:44、およびSEQ ID NO:50より選択される重鎖CDR3配列と変種Fc領域とを含むCD154結合タンパク質であって、該変種Fc領域が第1のアミノ酸残基およびN-グリコシル化部位を含み、該第1のアミノ酸残基が側鎖化学反応によって修飾されて、未修飾の第1のアミノ酸残基と比べて増大した立体容積または増加した静電荷を実現し、それによって、該N-グリコシル化部位でのグリコシル化のレベルを低下させ、該変種Fc領域が低いエフェクター機能を与える、CD154結合タンパク質。

[請求項141]

SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:44、およびSEQ ID NO:50より選択される重鎖CDR3配列と変種Fc領域とを含むCD154結合タンパク質であって、該変種Fc領域が第1のアミノ酸残基およびN-グリコシル化部位を含み、該第1のアミノ酸残基がシステインチオールを含み、それによって、該N-グリコシル化部位でのグリコシル化のレベルを低下させ、該変種Fc領域が天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える、CD154結合タンパク質。

[請求項142]

グリコシル化されていない、請求項101～112、116～127、および132～141のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項143]

低いエフェクター機能が、Fcレセプター(FcR)への減少した結合である、請求項135～137および140～141のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項144]

結合が、約1.5分の1もしくはそれ以下、約2分の1もしくはそれ以下、約3分の1もしくはそれ以下、約4分の1もしくはそれ以下、約5分の1もしくはそれ以下、約6分の1もしくはそれ以下、約7分の1もしくはそれ以下、約8分の1もしくはそれ以下、約9分の1もしくはそれ以下、約10分の1もしくはそれ以下、約15分の1もしくはそれ以下、約50分の1もしくはそれ以下、または約100分の1もしくはそれ以下に減少している、請求項143記載のCD154結合タンパク質。

[請求項145]

Fcレセプター(FcR)が、Fc RI、Fc RII、Fc RIIa、およびFc RIIIより選択される、請求項143記載のCD154結合タンパク質。

[請求項146]

低いエフェクター機能が、補体タンパク質への減少した結合である、請求項135～137および140～141のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項147]

補体タンパク質がC1qである、請求項146記載のCD154結合タンパク質。

[請求項148]

補体タンパク質への減少した結合が、約1.5分の1もしくはそれ以下、約2分の1もしくはそれ以下、約3分の1もしくはそれ以下、約4分の1もしくはそれ以下、約5分の1もしくはそれ以下、約6分の1もしくはそれ以下、約7分の1もしくはそれ以下、約8分の1もしくはそれ

10

20

30

40

50

以下、約9分の1もしくはそれ以下、約10分の1もしくはそれ以下、または約15分の1もしくはそれ以下である、請求項146または147記載のCD154結合タンパク質。

[請求項149]

代替の骨格を含む、請求項101～112、116～127、および132～148のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項150]

普遍的な(universal)フレームワークを含む、請求項101～112、116～127、および132～148のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項151]

可変重鎖および可変軽鎖より選択される単一の可変ドメインを含む、請求項101～112、116～127、および132～148のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

10

[請求項152]

CD154結合タンパク質であって、その結合親和性に基づいたCD154結合の飽和濃度またはそれ以上で存在する場合に、最初にCD154に添加された場合にはCD154に対する抗体5c8の結合を阻止し、かつ抗体5c8を添加した後に添加された場合にはCD154に結合している抗体5c8と置き換わる、CD154結合タンパク質。

[請求項153]

抗CD154抗体がエフェクターレセプターに結合しない、請求項101～112、116～127、および132～152のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項154]

対象に投与された場合に、抗体5c8の投与が引き起こすよりも少ない血栓塞栓性作用を引き起こす、請求項101～112、116～127、および132～153のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

20

[請求項155]

抗CD154抗体、抗体ポリペプチド、もしくはその断片を含むか、またはそれらからなる、請求項101～112、116～127、および132～154のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項156]

モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、マウス抗体、キメラ抗体、霊長類化抗体、ヒト化抗体、および完全ヒト抗体より選択される、請求項155記載の抗CD154抗体。

30

[請求項157]

多量体抗体、ヘテロ二量体抗体、ヘミ二量体(hemidimeric)抗体、四価の抗体、二重特異性抗体、および単鎖抗体、ならびにそれらの誘導体より選択される、請求項155記載の抗CD154抗体。

[請求項158]

修飾された第1のアミノ酸残基が機能的部分に連結されている、請求項101～112、116～127、および132～157のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項159]

機能的部分が、ブロッキング部分、検出可能部分、診断的部分、および治療的部分より選択される、請求項158記載のCD154結合タンパク質。

40

[請求項160]

機能的部分が、システイン付加物、混合ジスルフィド、ポリエチレングリコール、およびポリエチレングリコールマレイミドより選択されるブロッキング部分である、請求項158記載のCD154結合タンパク質。

[請求項161]

機能的部分が、蛍光性部分、発光性部分、および同位体部分より選択される検出可能部分である、請求項158記載のCD154結合タンパク質。

[請求項162]

機能的部分が、疾患または障害の存在を明らかにすることができる診断的部分である、請求項158記載のCD154結合タンパク質。

50

[請求項163]

機能的部分が、抗炎症剤、抗癌剤、抗神経変性剤、CD154以外に対する抗体またはその断片、および抗感染剤より選択される治療的部分である、請求項158記載のCD154結合タンパク質。

[請求項164]

修飾された第1のアミノ酸残基においてペグ化されている、請求項101～112、116～127、および132～163のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質。

[請求項165]

PEG-マレイミドでペグ化されている、請求項164記載のCD154結合タンパク質。

[請求項166]

請求項101～112、116～127、および132～165のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質または抗CD154抗体と、適切な薬学的担体とを含む、組成物。

10

[請求項167]

免疫抑制性または免疫調節性の化合物または作用物質をさらに含む、請求項166記載の組成物。

[請求項168]

請求項101～112、116～127、および132～165のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質または抗CD154抗体をコードする、単離された核酸。

[請求項169]

請求項168記載の核酸を含む、ベクター。

20

[請求項170]

請求項169記載の核酸を含む、宿主細胞。

[請求項171]

宿主細胞にCD154結合タンパク質を産生させるのに適した条件下で、請求項170記載の宿主細胞を培養する段階を含む、CD154結合タンパク質を産生させるための方法。

[請求項172]

CD40シグナル伝達によって全部または一部が媒介されるヒトの容態、障害、疾患、または前記のものいずれかの症状を処置または予防するための方法であって、それを必要とする対象に請求項166記載の薬学的組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、方法。

[請求項173]

CD40シグナル伝達によって全部または一部が媒介される1つもしくは複数の免疫応答、自己免疫応答、もしくは炎症応答、または前記のものいずれかの症状を抑制または予防するための方法であって、それを必要とする対象に請求項166記載の薬学的組成物の治療的有効量を投与する段階を含む、方法。

30

[請求項174]

炎症応答が、関節リウマチおよび全身性エリテマトーデスより選択される、請求項172または173記載の方法。

[請求項175]

症状が全身性エリテマトーデスに関連しているか、または疾患が全身性エリテマトーデスである、請求項174記載の方法。

40

[請求項176]

薬学的組成物が、抗体342または抗体338のエピトープ特異性を有するペグ化された抗CD154 Fab'抗体の治療的有効量を含む、請求項172～175のいずれか一項記載の方法。

[請求項177]

抗CD154 Fab'抗体342を含む、請求項176記載の方法。

[請求項178]

CD154への結合に関して一価であるヒト抗体ポリペプチド。

[請求項179]

CD154への結合に関して一価であるヒト抗体ポリペプチドであって、その結合親和性に基づいたCD154結合の飽和濃度またはそれ以上で存在する場合に、最初にCD154に添加された

50

場合にはCD154に対する抗体5c8の結合を阻止し、かつ抗体5c8を添加した後に添加された場合にはCD154に結合している抗体5c8と置き換わる、CD154への結合に関して一価であるヒト抗体ポリペプチド。

[請求項180]

請求項178または179記載のPEG結合ヒト抗体ポリペプチド。

[請求項181]

Fcドメインを含まない、請求項180記載のヒト抗体ポリペプチド。

[請求項182]

CD40に結合しているCD154とは置き換わらない、請求項101～112、116～127、および132～165のいずれか一項記載のCD154結合タンパク質または請求項178～181のいずれか一項記載のヒト抗体ポリペプチド。

10

[請求項183]

請求項113～115、128、および129のいずれか一項記載のDNA分子または請求項168記載の核酸の配列に少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、または100%同一である配列を含む、単離された核酸。

[請求項184]

SEQ ID

NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID

NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID

20

NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ

ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43,

SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO:

48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID

NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ

ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 または SEQ ID NO: 72

の配列に少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、または100%同一である配列を含む、単離されたタンパク質。

30

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】抗CD154抗体342、381、および338の相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を提供する表である。

【図2】ラット抗CD154抗体342のV_HドメインおよびV_Lドメインのアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する表である。下線を施した配列は、リーダー(すなわちシグナル)ペプチドをコードするヌクレオチド配列に対応する。

【図3】実施例においてヒト化抗CD154抗体を作製するために使用されるヒトアクセプターフレームワークのアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する表である。

40

【図4】図3において示すフレームワーク中に342CDRがグラフティングされたV_HドメインおよびV_Lドメインのアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する表である。

【図5】ヒトアクセプターフレームワーク中に342CDRがグラフティングされ、かつ、いくつかの重要なドナー残基が維持された、抗体342のV_Hドメイン(VH3 gH1およびVH4 gH1)のアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する表である。

【図6】ヒトアクセプターフレームワーク中に342CDRがグラフティングされ、かつ、いくつかの重要なドナー残基が維持された、抗体342のV_Lドメイン(VK1 gL4)のアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する表である。

【図7】抗体342の完全な軽鎖(可変軽鎖領域および定常軽鎖領域)ならびに重鎖領域の配列を提供する表である。シグナル/リーダーペプチドに対応する配列には下線を施してい

50

る。

【図8】Fab(SEQ ID NO: 28)型およびFab'(SEQ ID NO: 41)型のグラフト342 gL4gH1を製作するために使用された発現インサートのヌクレオチド配列である。シグナル/リーダー配列には下線を施し、(実施例2において説明するように、大腸菌(E. coli)発現ベクター中にクローニングするために使用される)制限部位は大文字で書き、太字で示している。

【図9】ラット342抗CD154抗体(ドナー)のアミノ酸配列と342抗体のヒト化において使用されたヒト生殖細胞系(アクセプター)フレームワークの軽鎖および重鎖のアライメントを示す。「軽鎖342」は、ラットV_Lドメイン配列である。「重鎖342」は、ラットV_Hドメイン配列である。CDR残基は太字にし、下線を施している。アクセプターフレームワークの軽鎖(2 1 1 012; SEQ ID NO: 35)ならびに重鎖(1-1 3-66; SEQ ID NO: 37および1-1 4-59; SEQ ID NO: 39)を示す。また、ヒト生殖細胞系アクセプターフレームワーク中へのCDRのみのグラフトも示す(VK1 gL3、VH3 gH7およびVH4 gH6)。ある種のヒト化重鎖および軽鎖において、342抗体のドナー残基はフレームワーク領域内で保持され、これらの重要なドナーフレームワーク残基は、太字イタリック体で示し、強調している。VK1 gL4のドナー内容物は、R38、Y71、およびS85である。VH3 gH1のドナー内容物は、V24、M48、G49、T73、およびV78である。VH4 gH1のドナー内容物は、M48、R71、およびV78である。示される軽鎖のSEQ ID NOは、上から下に順に、SEQ ID NO: 30(「342」)、SEQ ID NO: 35(「2 1 1 012」)、SEQ ID NO: 14(「342 gL3」)、およびSEQ ID NO: 2(「342 gL4」)である。示される重鎖(VH3グラフト)のSEQ ID NOは、上から下に順に、SEQ ID NO: 29(「342」)、SEQ ID NO: 37(「1-1 3-66」)、SEQ ID NO: 10(「342 gH7」)、およびSEQ ID NO: 1(「342 gH1」)である。示される重鎖(VH4グラフト)のSEQ ID NOは、上から下に順に、SEQ ID NO: 29(「342」)、SEQ ID NO: 39(「1-1 4-59」)、SEQ ID NO: 9の変種(「VH4 gH6」(SEQ ID NO: 74))、およびSEQ ID NO: 11の変種(「VH4 gH1」(SEQ ID NO: 75))である。図9に示すSEQ ID NO: 9変種およびSEQ ID NO: 11変種は、大腸菌で発現させると、(それぞれ図4および図5での「Q」の代わりに)アミノ酸「E」で始まる。したがって、これらの変種SEQ ID NO: 9およびSEQ ID NO: 11に対応するヌクレオチド配列は、「c」の代わりにヌクレオチド「g」で始まるという点で、SEQ ID NO: 19およびSEQ ID NO: 21に示すヌクレオチド配列と異なる。

【図10】抗CD154抗体381のV_LおよびV_Hのアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する。CDRアミノ酸配列には下線を施している。

【図11】抗CD154抗体338のV_LおよびV_Hのアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する。CDRアミノ酸配列には下線を施している。

【図12】選択的リンパ球抗体法(Selected Lymphocyte Antibody Method)(SLAM)によって単離されたラット抗ヒトCD154抗体を列挙した表である。この表は、Biacore(登録商標)、CD40結合アッセイ法、およびICAM-1上方制御アッセイ法においてこれらの抗体を用いて得られたK_d値およびIC₅₀値を提供する。抗体342を用いて得られたデータを強調している。

【図13】アグリコシル化された抗CD154抗体hu5c8(hu5c8 aglyP-huIgG4)の軽鎖のアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する。

【図14】アグリコシル化された抗CD154抗体hu5c8(hu5c8 aglyP-huIgG4)の重鎖のアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する。変種をアグリコシル化するために起こした変異(KabatのEU命名法ではS228P/T299A; 残基226および297)には、成熟タンパク質の配列中において下線を施し、太字で示す。

【図15】アグリコシル化された抗CD154抗体hu342(hu342 aglyP-huIgG4)の軽鎖のアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する。

【図16】アグリコシル化された抗CD154抗体hu342(hu342 aglyP-huIgG4)の重鎖のアミノ酸配列および対応するヌクレオチド配列を提供する。変種をアグリコシル化するために起こした変異(KabatのEU命名法ではS228P/T299A; 残基226および297)には、成熟タンパク質の配列中において下線を施し、太字で示す。

【図17】抗CD154抗体の例示的なFab'断片およびFab'断片の部位特異的ペグ化を示すゲ

ルを示す。Fab'は、PEG-マレイミドをヒンジの1つのシステイン残基と反応させることによってペグ化した。

【図18】Fab'断片および抗体-PEG結合体を含むヒト化342 gL4gH1抗体の様々な態様に関して、Biacore(登録商標)、CD40結合アッセイ法、ICAM-1上方制御アッセイ法、およびCD40L競合結合アッセイ法において得られた K_d 値および IC_{50} 値を提供する表である。

【図19】対照の生理食塩水または様々な用量の抗CD154抗体のいずれかを与えられたカニクイザルにおける抗TT(tetanus toxoid)IgGの力価の値を時間の関数として示した2つのグラフを示す。上のグラフは、抗体処置およびTTによるチャレンジ後の第0~20日のIgG力価の値を示し(一次免疫応答)、下のグラフは、30日目の抗体処置および2回目のTTチャレンジ後の第30~50日の値を示す。

10

【図20】様々な形式の抗CD154抗体を単一用量(hu5c8、アグリコシル5c8、およびアグリコシル342は20mg/kg、342Fab'-PEGおよび342DFM-PEGは40mg/kg)で与えられたカニクイザルにおける抗TT(tetanus toxoid)IgGの力価の値を時間の関数として示したグラフである。DFM-PEGは、ペグ化されたジマレイミド架橋で2つのFab'断片が架橋されている抗体断片である。

【図21】対照の生理食塩水または様々な用量の抗CD154抗体を与えられたカニクイザルにおける抗TT(tetanus toxoid)IgMの力価の値を時間の関数として示したグラフである。グラフは、TTチャレンジ後の第0~20日のIgM力価の値を示す(一次応答)。

【図22】342Fab'-PEG抗体およびhu5c8抗体のカニクイザルにおける薬物動態を比較したグラフである。

20

【図23】各パネルに示したように(23A-A33;23B-338;23C-402;23D-381;23E-300;23F-294;23G-335;23H-303)、第1の非標識抗CD154 Fab'と予め結合させた、CD154を発現するD1.1ジャーカット細胞に対する標識342Fab'の結合の交差プロッキングをフローサイトメトリーによって解析した結果を示す(実施例9を参照されたい)。A33は、アイソタイプを一致させた対照抗体であり、非特異的な交差プロッキングが無いことを裏付ける。

【図24】各パネルに示したように(24A-338;24B-402;24C-381;24D-303;24E-335;24F-300;24G-294;24H-A33)、第1の非標識抗CD154 Fab'と予め結合させた、CD154を発現するD1.1ジャーカット細胞に対する標識Hu5c8Fab'の結合の交差プロッキングをフローサイトメトリーによって解析した結果を示す(実施例9を参照されたい)。A33は、アイソタイプを一致させた対照抗体であり、非特異的な交差プロッキングが無いことを裏付ける。

30

【図25】図25A~Fは、可溶性CD154タンパク質(ECD)またはCD40:CD154複合体に対する様々な形態の342抗体およびHu5c8抗体の競合的結合をBiacore(登録商標)によって解析した結果を示す。FL-完全長。CD40hFc-ヒトCD40融合タンパク質。

【図26】Hu5c8抗CD154抗体、342Fab'-PEG抗CD154抗体、および対照抗体を用いて実施した実施例11で説明する血小板凝集アッセイ法(アッセイ法1)の結果を示すグラフである。1つ目のパネルは、全IgGと共に形成されたCD40L複合体を用いて得られた結果を示し、2つ目のパネルは、Fab'-PEGまたはジFab'-PEGと共に形成された複合体を示す。3つ目のパネルは、トリFab'-PEGおよびアグリコシル化された抗CD154抗体hu342を用いて得られた結果を示す。

【図27】陽性対照抗体および陰性対照抗体を用いて実施した実施例11で説明する血小板凝集アッセイ法(アッセイ法2)の結果を示すグラフである。これらの結果から、血小板凝集が、陽性対照の抗CD154抗体および組換えヒト可溶性CD40L(sCD154)の複合体によって特異的に亢進されることが実証される。

40

【図28】ヒト(SEQ ID NO:76)およびマウス(SEQ ID NO:77)の可溶性CD40Lアミノ酸配列の配列アラインメントを示す。ヒト配列とマウス配列の相違を赤色で表示する。Hu5c8エピトープ配列を青色で表示する。内部残基には「|」のしるしをつけている。ヒト残基が可溶性マウスCD40L中に導入されている、配列の6つの領域(1~6)を選択した。

【図29】342Fab'およびhu5c8Fab'の交差プロッキングを実証する競合ELISAアッセイ法の結果を示す(実施例14を参照されたい)。図29Aは、CD154に対するビオチン342Fab'の滴定(titration)の結果を示す。濃度1nMが、曲線の直線部分上にある。図29Bは、CD154に対

50

するビオチンhu5c8Fab'の滴定の結果を示す。濃度0.3nMが、曲線の直線部分上にある。図29Cは、非標識342Fab'によるビオチン342およびビオチン5c8の交差ブロッキングを示す。ch342 Fabはキメラ342Fab'である。図29Dは、非標識5c8Fab'によるビオチン342の交差ブロッキングを示す。

【発明を実施するための形態】

【0078】

発明の詳細な説明

本明細書において説明する本発明をより完全に理解できるように、以下の詳細な説明を述べる。他に規定されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が関連する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。例示的な方法および材料を後述するが、本明細書において説明するものと同様または等価な方法および材料もまた、本発明の実践に際して使用され得、当業者には明らかであると考えられる。

10

【0079】

本出願の全体を通して、様々な特許、刊行物、および参考文献が参照される。これらの特許、刊行物、および参考文献の開示内容は、その全体が参照により本出願の本明細書に組み入れられる。

【0080】

当業者に公知である組換えDNA技術の一般的原理を述べた標準的な参考著作物には、Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1998年、2001年の補遺); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989); Kaufman et al. 編、*Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine*, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson 編、*Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991)が含まれる。

20

【0081】

当業者に公知である免疫学の一般的原理を述べた標準的な参考著作物には、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1999); ならびに Roitt et al., *Immunology*, 第3版、Mosby- Year Book Europe Limited, London (1993)が含まれる。当業者に公知である医学生理学および医学薬理学の一般的原理を述べた標準的な参考著作物には、Fauci et al. 編、*Harrison 's Principles Of Internal Medicine*, 第14版、McGraw-Hill Companies, Inc. (1998)が含まれる。

30

【0082】

定義

本明細書において使用される場合、「CD154結合タンパク質」という用語は、CD154に特異的に結合するか、または拮抗する、抗体を含む任意の分子を含む。したがって、本明細書において使用される場合、抗CD154抗体は、CD154特異的結合タンパク質の1つのクラスである。本発明のCD154結合タンパク質は、本明細書において開示する少なくとも1つ、好ましくは2つ、3つ、またはそれ以上のCDRを含んでよい。CD154結合タンパク質または他のこのようなCD154拮抗物質は、古典的な抗体断片でも誘導体でもないが、それでもなお、CD154エピトープ結合特異性を与えるアミノ酸配列および/または化学構造を含む化学種を包含してよい。このようなCD154拮抗物質は、例えば、代替の骨格から作製することができる(例えば、Binz et al. 2005 *Nat Biotech* 23:1257-1268およびHosse et al. 2006 *Protein Science* 15:14-27を参照されたい)。このようなCD154結合タンパク質または拮抗物質は、機能的に欠陥のある抗体Fc領域または本明細書において説明する異種の機能的部分に融合させて、CD154結合タンパク質の半減期および/または他のインビボ特性を改善してもよい。

40

【0083】

CD154結合タンパク質は、生体適合性のフレームワーク構造物中に組み入れられた、本

50

明細書において説明する少なくとも1つのCDRを含んでよい。1つの例において、生体適合性のフレームワーク構造物は、抗原に結合する1つまたは複数のアミノ酸配列(例えば、CDR、可変ドメインなど)を局所的な表面領域において提示することができる立体配置的に安定な構造支持体、またはフレームワーク、もしくは骨格を形成するのに十分であるポリペプチドまたはその一部分を含む。このような構造物は、天然に存在するポリペプチドもしくはポリペプチド「フォールド」(構造モチーフ)でよいか、または天然に存在するポリペプチドもしくはフォールドと比べて、アミノ酸の付加、欠失、もしくは置換など1つまたは複数の修飾を有してよい。これらの骨格は、ヒト、他の哺乳動物、他の脊椎動物、無脊椎動物、植物、細菌、またはウイルスなど任意の種(または複数の種)のポリペプチドに由来してよい。

10

【0084】

典型的には、生体適合性フレームワーク構造物は、免疫グロブリンドメイン以外のタンパク質骨格または骨組み(skeleton)をベースとする。例えば、フィブロネクチン、アンキリン、リポカリン、ネオカルチノステイン(neocarzinostatin)、シトクロムb、CP1亜鉛フィンガー、PSTI、コイルドコイル、LACI-D1、Zドメイン、およびテンドラミサト(tendramisat)ドメインをベースとするものが使用され得る(例えば、NygrenおよびUhlen, 1997, *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 463-469を参照されたい)。

【0085】

本発明に関して本明細書において使用される「抗体」という用語は、単離された抗体、組換え抗体、または合成抗体、抗体結合体、または抗体誘導体を含む。「抗体」という用語はしばしば、文脈において別段の定めも無く、他の意味で理解されもしない限り、抗原結合断片を含む抗体断片を含むと意図される。抗原結合断片は、特異的結合において、完全な抗体と競合する。一般には、*Fundamental Immunology*, 第7章(Paul, W. 編、第2版、Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。抗原結合断片は、組換えDNA技術によって、または完全な抗体の酵素的切断もしくは化学的切断によって作製することができる。いくつかの態様において、抗原結合断片には、Fab、F(ab)₂、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fd、Fv、ドメイン抗体(dAb)、他の一価および二価の断片、相補性決定領域(CDR)断片、単鎖抗体(例えば、scFv、scFab、およびscFab C)、キメラ抗体、ダイアボディ、トリアボディ、ミニボディ、ナノボディ、ならびにそのポリペプチドへの特異的抗原結合を与えるのに十分である抗体の少なくとも一部分を含むポリペプチド;ならびに前記のもの融合物および誘導体が含まれる。例えば、HolligerおよびHudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005)ならびにHust et al., *BMC Biotech* 7:14 (2007)を参照されたい。

20

30

【0086】

「Fd断片」は、V_HドメインおよびC_{H1}ドメインからなる抗体断片であり;「Fv断片」は、抗体の単一のアームのV_LドメインおよびV_Hドメインからなり;「scFv断片」は、ペプチドリinkerによって連結された重鎖可変領域(V_H)および軽鎖可変領域(V_L)を含む単鎖抗体であり;「scFab断片」は、ペプチドリinkerによって軽鎖に連結されたフラグメントディフィカルト(fragment difficult)(Fd)を含む単鎖抗体であり;「scFab C」断片は、システインを含まないscFab変種であり(例えば、Hust et al., 前記を参照されたい);「dAb断片」(単ドメイン抗体)は、単一の可変ドメイン(例えば、V_HドメインまたはV_Lドメイン)を含む(Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989))。さらに、ダイアボディおよびトリアボディもまた、含まれる。本発明のダイアボディおよびトリアボディには、例えば、ホモ二量体およびヘテロ二量体のダイアボディおよびトリアボディが含まれる。例えば、特定の態様において、トリアボディを構成する可変ドメインは、3つの異なるエピトープまたは同一のエピトープに結合し得る。

40

【0087】

別段の定めが無い限り、または文脈において他の意味が暗示されない限り、本発明の「抗体」には、全抗体およびその任意の抗原結合断片、1つまたは複数の修飾(例えば、アミノ酸の挿入、欠失、置換、翻訳後修飾、またはその欠如など)を含み得る抗体誘導体または抗体変種(抗体結合体(すなわち、機能的部分に結合されるか、またはそれと結合した抗

50

体またはその抗体結合断片)を含む)が含まれる。抗体結合体を含む抗体誘導体は、CD154に特異的に結合する本発明の抗原結合断片をベースとしてよいか、またはそれを含んでよい。さらに、前述の抗体の態様は、マウス抗体、ハムスター抗体、ヤギ抗体、ウサギ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または完全ヒト抗体、断片、誘導体、または結合体でよい。本発明の特定の局面において、「抗体」という用語は、上記に挙げた抗体態様のうち1つまたは複数を除外してよいことが理解される;このような条件は、当業者に明らかであると考えられる。

【0088】

「ペグ化」、「ポリエチレングリコール」、または「PEG」という用語は、ポリアルキレングリコール化合物またはその誘導体を含み、結合剤の有無も、結合部分または活性化部分(例えば、チオール、トリフラート、トレスラート、アジリジン(azirdine)、オキシラン、または好ましくはマレイミド部分、例えば、PEG-マレイミド)による誘導体化の有無も問わない。他の適切なポリアルキレングリコール化合物には、マレイミドモノメトキシPEG、活性化されたPEGポリプロピレングリコールだけでなく、以下のタイプの荷電ポリマーまたは中性ポリマー、すなわちデキストラン、コロミン酸、または他の炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー、およびビオチン、ならびに他の親和性反応物誘導体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0089】

「エフェクター機能」という用語は、抗体のFc領域または定常領域が免疫系のタンパク質および/または細胞に結合する機能的な能力を意味する。低いエフェクター機能有する抗体およびそのような抗体を人工的に作り出すための方法は当技術分野において周知であり(例えば、WO 05/18572、WO 05/03175、およびUS 6,242,195を参照されたい)、本明細書においてさらに詳細に説明する。典型的なエフェクター機能には、補体タンパク質(例えば、補体タンパク質C1q)、ならびに/またはFcレセプター(FcR)(例えば、Fc RI、Fc RII、Fc RIIa、Fc RIII、および/もしくはFc RIIIb)に結合する能力が含まれる。1つまたは複数の前述の分子に結合できることの機能的意義には、オプソニン作用、食作用、抗原依存性細胞障害(ADCC)、補体依存性細胞障害(CDC)、および/またはエフェクター細胞調節が含まれるがそれらに限定されるわけではない。エフェクター機能の低下とは、抗体(またはその断片)の可変領域の抗原結合活性を維持しつつ、結合親和性がたとえ低くても、同様でも、同一でも、高くても、Fcがその同族レセプターまたは補体タンパク質もしくはエフェクター細胞に結合することによって少なくとも部分的に誘導される1つまたは複数の生化学的活性または細胞活性の減少を意味する。本発明の特定の抗体は、低いエフェクター機能を示す。エフェクター機能の低下、例えば、Fcレセプターまたは補体タンパク質へのFc結合は、低下の倍率によって表すことができ(例えば、1.5分の1、および2分の1に低下など)、例えば、当技術分野において公知の結合アッセイ法を用いて測定した結合活性の低下率(パーセント)に基づいて算出することができる(例えば、WO 05/18572を参照されたい)。

【0090】

文脈において特に必要とされない限り、単数形の実語は複数形を含むものとし、複数形の実語は単数形を含むものとする。

【0091】

本明細書および特許請求の範囲の全体を通して、単語「含む(comprise)」または「含む(comprises)」もしくは「含む(comprising)」などの変形は、記載された整数または整数群を含むことを意味するが、他の任意の整数または整数群を除外することを意味しないと理解される。

【0092】

CD154

CD154は、当技術分野において、CD40リガンド(CD40L)、CD40カウンターレセプター(CD40CR)、gp39、T-BAM、T細胞活性化分子、TRAF、TNF関連活性化タンパク質(TRAP)、および腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー5(TNFSF5)などいくつかの他の名称で

10

20

30

40

50

公知である(Gauchat et al., 1993 FEBS Lett. 315:259-266;Graf et al. 1992, Europ.J. Immun. 22:3191-3194; Hollenbaugh et al., 1992 EMBO J. 11:4313-4321)。これらの用語は、本出願の全体を通して同義的に使用される。抗体を含む本発明のCD154結合タンパク質は、ヒトCD154に特異的に結合し、かつ、交差反応し、したがって他の種のCD154に特異的に結合し得る。特定の態様において、抗体を含む本発明のCD154結合タンパク質は、ヒトCD154、マウスCD154、または非ヒト霊長類CD154に特異的に結合する。

【0093】

抗CD154抗体およびCD154結合タンパク質

本明細書において使用される「抗CD154抗体」という用語は、CD154抗原上のエピトープに特異的に結合できる免疫グロブリン分子を意味する。抗CD154抗体は、天然供給源または組換え供給源に由来する完全な免疫グロブリンでよく、かつ、完全な免疫グロブリンの免疫反応性部分でもよい。抗体は、典型的には、免疫グロブリン分子の四量体である。

10

【0094】

したがって、本発明の態様および方法のすべてにおいて言及される場合、「抗CD154抗体」は、(別段の指示も無く、文脈において特に示唆もされない限り)、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、マウス抗体、ハムスター抗体、ヤギ抗体、ウサギ抗体、キメラ抗体、霊長類化抗体、ヒト化抗体、(完全)ヒト抗体、多量体抗体、ヘテロ二量体抗体、ヘミ二量体抗体、二価、三価、または四価の抗体、二重特異性抗体、単鎖抗体(例えば、scFv、scFab、およびscFab C)、ビス-scFv、ダイアボディ、トリアボディ、またはテトラボディ、単ドメイン抗体、および修飾されたFab断片を包含する。特定の態様において、抗CD154抗体は、単一の免疫グロブリン可変ドメインのみを含む抗体である。したがって、一価抗体には、ただ1つの免疫グロブリン可変ドメイン(すなわち、単一の可変軽鎖または可変重鎖)を含み、CD154に特異的に結合する抗体が含まれる。さらに、本発明の抗CD154抗体は、CD154に対して一価、二価、または多価でよい。

20

【0095】

特定の態様において、低いエフェクター機能を有するCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、CD154抗原への特異的結合を維持するのに十分である、抗CD154抗体の任意の一部を含む。例えば、抗体は、単一の免疫グロブリン可変ドメイン、すなわちV_HドメインまたはV_Lドメインのみを含んでよい。

【0096】

したがって、特定の態様において、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、抗体断片である。抗体断片には、例えば、Fab断片、F(ab)₂断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、F(ab')₃断片、単鎖F(v)断片、またはF(v)断片、および上記のいずれかのエピトープ結合断片が含まれる(例えば、HolligerおよびHudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136を参照されたい)。本発明の抗体断片を下記により詳細に説明する。

30

【0097】

1つの例において、CD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、天然のヒンジ領域または修飾されたヒンジ領域を有する抗体(例えばIgG4サブタイプの抗体)または断片(例えばFab'断片)である。いくつかの修飾されたヒンジ領域が、例えば、US 5,677,425、WO 99/15549、およびWO 98/25971において説明されている。別の例において、本発明の抗体は、WO 05/003169、WO 05/003170、およびWO 05/003171において説明されている抗体のように、定常領域が修飾されている。前述の抗CD154抗体、抗体誘導體、または抗体断片のいずれかを用いて、本発明の抗体結合体を形成させることができる。上記の抗体、断片、および結合体のいずれかは、第2の抗CD154抗体と比べて低いエフェクター機能を引き出し得る。

40

【0098】

本発明の抗体分子は、任意のクラス(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、もしくはIgA)またはサブクラスの免疫グロブリン分子のものでよい。抗体の定常領域ドメインは、存在する場合には、抗体分子の提唱されている機能を考慮して選択してよい。例えば、定常領域ドメインは、ヒトIgA、IgD、IgE、IgG、またはIgMのドメインでよい。特に、ヒトIgG、特にIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4の定常領域ドメインが使用され得る。IgG2アイソタイプお

50

よびIgG4アイソタイプは、抗体エフェクター機能の低下または排除が望まれる治療的用途のために抗体分子が用いられる特定の態様において使用され得る。あるいは、抗体エフェクター機能が必要とされる治療目的のために抗体分子が用いられる場合には、IgG1アイソタイプおよびIgG3アイソタイプが使用され得る。

【0099】

いくつかの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗体の1つまたは複数のCDRは、1つまたは複数の免疫グロブリンドメイン、普遍的なフレームワーク、タンパク質骨格、または免疫グロブリンドメイン以外のタンパク質骨格もしくは骨組みをベースとする他の生体適合性フレームワーク構造物中に組み入れられてよい(NygrenおよびUhlen, 1997, *Curr. Opin. Strural Biol.* 7:463-469; Saragovi et al, 1992, *Bio/Technology* 10:773-779; Skerra, 2000, *J. Mol. Recognition* 13:167-187)。特定の態様において、抗CD154抗体のCDRは、普遍的なフレームワーク(すなわち、様々なフレームワークの大集団によって本来維持されている機能、特異性、または特性の最大限の多様性を作り出すために使用され得るフレームワーク、US 6,300,064を参照されたい)中に組み入れられる。他の態様において、代替の骨格(例えば、Binz et al. 2005 *Nat Biotech* 23:1257-1268およびHosse et al. 2006 *Protein Science* 15:14-27を参照されたい)が、本発明のCD154結合タンパク質を作り出すために使用され得る。

【0100】

「抗CD154抗体」という用語はまた、合成抗体または組換えDNA技術を用いて作製された組換え抗体、例えば、バクテリオファージによって発現された抗体も包含する。また、「抗CD154抗体」という用語は、抗体をコードするDNA分子(DNA分子は、抗体タンパク質を発現する)または抗体を指定するアミノ酸配列の合成によって作製された抗体も含むと解釈されるべきであり、このDNA配列またはアミノ酸配列は、当技術分野において利用可能かつ周知である合成DNA技術または合成アミノ酸配列技術を用いて得られた。

【0101】

1つの態様において、本発明は、モノクローナル抗体である「抗CD154抗体」を提供する。モノクローナル抗体とは、実質的に同種の抗体集団から得られた抗体を意味する。すなわち、この集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る、天然に存在する可能性がある変異を除いて同一である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られたものとして抗体の特徴を示し、任意の特定の的方法による抗体の作製を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるべきモノクローナル抗体は、Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)によって最初に説明されたハイブリドーマ(マウスまたはヒト)法によって作製してよく、または組換えDNA法(例えばUS 4,816,567を参照されたい)によって作製してよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)において説明されている技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。また、本発明の特定の態様が、CD154に特異的に結合する1つまたは複数の異なるモノクローナル抗体を含む組成物、すなわち様々なエピトープ特異性を有する、複数のモノクローナル抗体を含むポリクローナルな抗体組成物に関することも理解される。

【0102】

本発明の別の態様において、「抗CD154抗体」とは、キメラ抗体、または抗体誘導体もしくは抗体結合体、またはその抗原結合断片である抗体を意味する。典型的には、キメラ抗体は、別の種(典型的にはヒト)の定常領域に融合された、1つの種(典型的にはマウス)の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域(CDR残基およびフレームワーク領域の両方を含む)を含む。これらのマウス/ヒトキメラ抗体は、約75%のヒトアミノ酸配列およびおよび25%のマウスアミノ酸配列を含む。ヒト配列は、抗体の定常領域に相当し、マウス配列は、抗体の可変領域(および、したがって抗原結合部位を含む)に相当する。

【0103】

別の態様において、本発明のCD154結合タンパク質、抗CD154抗体には、1つの抗体に由

10

20

30

40

50

来するフレームワーク領域および別の抗体に由来するCDR領域を含む可変ドメインを含む抗体、抗体誘導體、および抗原結合断片が含まれる。

【0104】

より具体的な態様において、本発明のCD154結合タンパク質および抗CD154抗体には、異なるヒト抗体に由来するフレームワーク領域およびCDR領域を含むキメラ抗体が含まれる。

【0105】

前述のキメラ抗体のすべてを作製する方法は、当業者に周知である。例えば、US 5,807,715; Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(21):6851-5; Sharon et al. (1984) Nature 309(5966):364-7; Takeda et al. (1985) Nature 314(6010):452-4

10

を参照されたい。

【0106】

本発明の特定の態様において、CD154に結合する抗CD154抗体は、インビボでの免疫応答の間に高親和性抗体を産生する任意の種の細胞からの単離を可能にする、選択的リンパ球抗体法(SLAM)(Babcook et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 7843-7848; WO 92/02551; de Wildt et al., 1997, J. Immunol. Methods, 207:61-67およびLagerkvist, et al., 1995, BioTechniques 18:862-869)によって作製される。他の技術には、de Wildt et al., 1997, J. Immunol. Methods, 207:61-67およびLagerkvist et al., 1995, BioTechniques 18(5):862-869によって説明されているものが含まれる。上記の方法は、個々の抗体産生細胞の単離に依拠し、次いでこれらの細胞をクローン増殖させ、続いて、抗CD154抗体を産生するクローンを求めてスクリーニングし、続いて、それらの可変重鎖(V_H)遺伝子および可変軽鎖(V_L)遺伝子の配列を引き続き同定する。具体的なスクリーニング方法は、WO 04/051268に詳述されている。このようにして、CD154に対する抗体に関して陽性であるB細胞が単離される。B細胞は、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、または他の哺乳動物種に由来してよい。これらのB細胞中の抗体遺伝子は、例えば、従来の組換えDNA技術によって、クローン化し、宿主細胞において発現させることができる。特定の態様において、宿主細胞は大腸菌である。他の宿主細胞は下記に詳述する。これらの細胞において発現される抗体(Fab'断片のような抗体断片を含む)は、従来手段によって精製することができる。抗体が非ヒト供給源に由来する場合、それらの遺伝子の変異誘発のような従来の方法によって、これらの抗体をヒト化してよい。ヒト化抗体は、続いて

20

30

宿主細胞において発現させることができ、精製することができる。

【0107】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術(KohlerおよびMilstein, Nature, 1975, 256:495-497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today, 1983, 4, 72)、およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., 「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」、77~96頁、Alan R. Liss, Inc., 1985)など当技術分野において公知である任意の方法によって調製することができる。組換え抗体を作り出すため、および製造するための方法は、当技術分野において周知である(例えば、US 4,816,397; US 6,331,415; Simmons et al., 2002, Journal of Immunological Methods, 263, 133-147; WO 92/02551; Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833

40

; Riechmann et al., 1988, Nature, 322, 323; US 5,585,089; WO 91/09967; MountainおよびAdair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma et al., 1998, J. Immunol. Methods, 216:165-181; HolligerおよびHudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136を参照されたい)。

【0108】

本発明の抗体はまた、当技術分野において公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することもでき、Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184, 177-186; Kettleborough et al. 1994, Eur. J. Immunol., 24, 952-958; Persic et al., 1997, Gene, 187, 9-18;およびBurton et al., 1994, Advances in Immunol., 57, 191-280; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/0

50

1047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; およびWO 95/20401; ならびにUS 5,698,426; 同5,223,409; 同5,403,484; 同5,580,717; 同5,427,908; 同5,750,753; 同5,821,047; 同5,571,698; 同5,427,908; 同5,516,637; 同5,780,225; 同5,658,727; 同5,733,743; および同5,969,108によって開示されているものが含まれる。

【0109】

また、トランスジェニック(例えば、遺伝的に操作された)マウス、または他の哺乳動物を含む他の生物を用いて、本発明の結合タンパク質および抗体を産生させることもできる(例えばUS 6,300,129を参照されたい)。例えば、マウスの免疫遺伝子座の可変領域(重鎖のVセグメント、Dセグメント、およびJセグメント、ならびに軽鎖のVセグメントおよびJセグメント)のみを対応するヒト可変配列で置き換えるように操作されたマウスを用いて、ヒト可変配列を有する大量の高親和性抗体を産生させ得ることが公知である(例えば、US 6,586,251; US 6,596,541、およびUS 7,105,348を参照されたい)。

10

【0110】

本発明の別の態様において、「抗CD154抗体」とは、霊長類化またはヒト化されている抗体、抗体誘導体もしくは抗体結合体、または抗原結合断片を意味する。霊長類化抗体およびヒト化抗体は、典型的には、非ヒト霊長類抗体またはヒト抗体のV領域フレームワーク中にグラフィティングされた、マウス抗体由来の重鎖CDRおよび/または軽鎖CDRを含み、通常、ヒト定常領域をさらに含む。例えば、Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; US 6,054,297; 同5,821,337; 同5,770,196; 同5,766,886; 同5,821,123; 同5,869,619; 同6,180,377; 同6,013,256; 同5,693,761; および同6,180,370を参照されたい。

20

【0111】

このような霊長類化抗体またはヒト化抗体を使用する論理的根拠は、マウスCDRによって与えられるマウス抗体の(ヒト)抗原特異性を保持するが、できるだけ多くのヒトフレームワーク配列を用いることによって、マウス抗体の免疫原性(マウス抗体は、マウス以外の種においてそれに対する免疫応答を引き起こすと考えられる)を減少させることである。このような抗体は、免疫応答のような望まれない副作用を最小限に抑えるか、または無くすために、ヒト療法において使用することができる。抗原特異的な非ヒト抗体から同種の非ヒト霊長類のアクセプターフレームワーク上にグラフィティングされたドナーCDRを含み、ヒトにおける免疫原性を減少させた抗体が説明されている(US 2005/0208625; US 2002/0062009; US 7,338,658)。

30

【0112】

したがって、非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリン配列およびヒト免疫グロブリン配列に由来する配列を含む、特異的キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらの断片(Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、もしくは抗体の他の抗原結合部分配列など)である。たいていは、ヒト化抗体は、レシピエント抗体の相補性決定領域(CDR)に由来する残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRに由来する残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒトFR残基で置き換えられる。

40

【0113】

さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されるCDR配列またはFR配列にも存在しない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに改良し、最適化するために施される。一般に、ヒト化抗体は、すべてまたは実質的にすべてのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、すべてまたは実質的にすべてのFR領域がヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のものである少なくとも1つ、および典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含んでもよい。また、ヒト化抗体は、任意で、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのものも含んでもよい。

【0114】

ヒト化抗体(例えば、抗体断片、および抗体誘導体または抗体結合体を含む)は、組換えDNA技術によって作製することもでき、その際、抗原結合のために必要とされていないヒ

50

ト免疫グロブリンの軽鎖または重鎖のアミノ酸の一部またはすべて(例えば、定常領域および可変ドメインのフレームワーク領域)を用いて、非ヒト同族抗体の軽鎖または重鎖由来の対応するアミノ酸を置換する。ヒト化抗体を作製するための方法は、抗体技術分野の熟練者には周知である。例えば、EP 239400; Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536; Queen et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029; Orlandi et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833; US 6,180,370、および表面残基の抗体ベニアリングを説明したEP 519596を参照されたい。

【0115】

したがって、本発明の1つの態様において、抗CD154抗体とは、マウスもしくはラット(または他の非ヒト)CDRをヒト抗体上に移植することによって作製された、ヒト化抗体(ヒト化抗原結合断片およびヒト化抗体誘導体またはヒト化抗体結合体を非限定的に含む)を意味する。より具体的には、このヒト化は、以下のようにして実現される：(1)抗体を分泌するハイブリドーマまたはB細胞から、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインをコードするcDNAを単離する；(2)CDRを含む可変ドメインのDNA配列を配列決定によって決定する。(3)部位特異的変異誘発により、CDRをコードするDNAをヒト抗体の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインをコードする配列の対応する領域に移入する；ならびに(4)所望のアイソタイプのヒト定常領域遺伝子セグメント(例えば、CHに対する1およびCLに対するk)を付加する。最後に、ヒト化した重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を哺乳動物宿主細胞(例えば、CHO細胞またはNS0細胞)において同時発現させて、可溶性ヒト化抗体を産生させる。

【0116】

時折、ヒトフレームワークへのCDRの直接的移入により、結果として得られる結合タンパク質または抗体の抗原結合親和性が失われることがある。いくつかの同族抗体において、フレームワーク領域内のある種のアミノ酸がCDRと相互に作用し、それによって、抗体の全体的な抗原結合親和性に影響を与えるため、抗原結合親和性の喪失が起こり得る。このような場合、熟練した研究者は、同族抗体の抗原結合活性を保持するために、アクセプター抗体のフレームワーク領域中に「復帰変異」を導入することが非常に重要であることを理解すると考えられる。復帰変異を起こすための一般的なアプローチは、当業者には周知である。例えば、Queen et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029; Co et al. 1991. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:2869-2873; WO 90/07861; Tempest 1991. Bio 30
technology 9:266-271を参照されたい。本発明の抗体の例示的な復帰変異には、ドナー内容物として(under donor content)図9に示すような残基が含まれる。

【0117】

特定の態様において、本発明の結合タンパク質または抗体は、ラクダ科の動物の免疫グロブリン可変ドメインでもマウス免疫グロブリン可変ドメインでもないV_Hドメインを含んでよい。特定の態様において、抗体ポリペプチドは、ヒトV_Hドメインと比べてラクダ科の動物の免疫グロブリン可変ドメインに特異的である1つまたは複数のアミノ酸を含まないV_Hドメインを含んでよい。

【0118】

本発明の1つの態様において、「抗CD154抗体」とは、完全にヒト由来である抗体(抗原結合断片および抗体誘導体または抗体結合体を含む)を意味する。完全「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンに由来する配列(例えば、ヒト免疫グロブリンのコード配列から得られる)を有する抗体ポリペプチドまたは免疫グロブリン可変ドメインを含む。「ヒト抗体」という用語は、例えば、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域(存在する場合には)を有する抗体を含む。本明細書において抗体または可変ドメインのような断片に適用される「ヒト」という用語は、抗体ポリペプチド上へのヒト定常領域配列のグラフィング(すなわち、非ヒト定常領域をヒト定常領域で置き換えること)によって、または非ヒト哺乳動物に由来する免疫グロブリン可変ドメイン上へのヒトV領域フレームワーク配列のグラフィング(すなわち、Vドメインの非ヒトフレームワーク領域をヒトフレームワーク領域で置き換えること)によって「ヒト化」された、別の種、例え 40
50

ばマウスに由来する抗体を包含しない。相補性決定残基の合理的修飾を通じて免疫グロブリン可変領域をヒト化する方法は、説明されている(US 2006/0258852)。

【0119】

特定の態様において、ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異)を含んでよい。したがって、特定の態様において、本発明は、1つまたは複数のフレームワーク領域(例えば、FW1、FW2、FW3、および/またはFW4)を有する可変ドメインを含む抗CD154抗体であって、このフレーム領域が、ヒト生殖系列抗体遺伝子セグメントにコードされた対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同じであるアミノ酸配列、またはヒト生殖系列抗体遺伝子セグメントにコードされた該対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と比べて、あわせて最大5個のアミノ酸相違を含む1つもしくは複数の該フレームワーク領域のアミノ酸配列を含む、抗CD154抗体に関する。さらなる態様において、可変ドメインのフレームワーク領域(FW1、FW2、FW3、およびFW4)のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列抗体遺伝子セグメントにコードされた対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同じであるか、または、FW1、FW2、FW3、およびFW4の配列は、ヒト生殖系列抗体遺伝子セグメントにコードされた対応するフレームワーク領域の配列と比べて、あわせて最大10個のアミノ酸相違を含む。例示的な生殖系列抗体遺伝子セグメントには、例えば、DP47、DP45、DP48、およびDPK9(US 2006/0062784)、ならびに実施例および図面において説明するアクセプターフレームワーク配列をコードするセグメントが含まれる。

【0120】

いくつかの態様において、ヒト抗体(抗体断片または可変ドメイン配列を含む)は、天然に存在するヒト抗体に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性(例えば、87%、90%、93%、95%、97%、99%またはそれ以上の配列同一性を含む)を有する。

【0121】

完全ヒト抗体またはヒト抗体は、ヒト抗体遺伝子(可変性(V)エキソン、多様性(D)エキソン、連結(J)エキソン、および定常(C)エキソンを有する)を有するトランスジェニック(例えば、ノックインのような遺伝的に操作された)マウス、またはヒト細胞由来のヒトV領域、D領域、およびJ領域に由来してよい。例えば、免疫化した際に、内因性の免疫グロブリン産生の不在下で、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができる、遺伝的に操作された動物(例えばマウス)を作製することが現在可能である(例えば、Jakobovits et al., PNAS, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993);およびDuchosal et al. Nature 355:258 (1992)を参照されたい)。トランスジェニック(例えば、ノックアウト、ノックイン、および遺伝子置換などを含む遺伝的に操作された)マウス系統は、再配列されていないヒト免疫グロブリン遺伝子に由来する遺伝子配列を含むように操作することができる。ヒト配列は、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードしてよく、マウスにおいて正しく機能し、再配列を経て、ヒトにおけるものと類似した広範囲の抗体レパートリーを提供すると思われる。遺伝的に操作されたマウスを標的タンパク質(例えば、CD154、その断片、またはCD154を発現する細胞)で免疫化して、多様な多数の特異的抗体およびそれらをコードするRNAを作り出すことができる。次いで、このような抗体の抗体鎖構成要素をコードする核酸を、動物からディスプレイベクター中にクローニングすることができる。典型的には、重鎖配列および軽鎖配列をコードする核酸の別々の集団をクローニングし、次いで、ベクターの任意の所与のコピーが重鎖および軽鎖のランダムな組合せを受け取るように、ベクター中に挿入する際にこれらの別々の集団を再び組み合わせる。ベクターは、ベクターを含むディスプレイパッケージの外表面に抗体鎖が集められ、ディスプレイされ得るように、抗体鎖を発現するように設計される。例えば、抗体鎖は、ファージの外表面に由来するファージコートタンパク質との融合タンパク質として発現され得る。その後、標的に結合する抗体のディスプレイを得るために、ディスプレイパッケージをスクリーニングしてよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 2 】

さらに、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーに由来してよい(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al. Nature Biotech 14:309 (1996), US 6,300,064)。合成のヒト抗体V領域のランダムな組合せを使用する合成ファージライブラリーを作製してよい。抗原に基づいた選択によって、V領域が天然に非常にヒトに似ている完全ヒト抗体を作製することができる。US 6,794,132、同6,680,209、同4,634,666、およびOstberg et al. (1983), Hybridoma 2:361-367を参照されたい。

【 0 1 2 3 】

ヒト抗体の作製に関しては、Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997)、Gre 10
enおよびJakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)も参照されたい。ヒト抗体は、US 5,939,598および同6,673,986においてさらに考察され、詳細に記述されている。US 6,114,598、同6,075,181、および同6,162,963もまた、参照されたい。また、US 6,150,584、US 6,713,610、US 6,657,103、US 2003/0229905 A1、US 2004/0010810 A1、US 2004/0093622 A1、US 2006/0040363 A1、US 2005/0054055 A1、US 2005/0076395 A1、およびUS 2005/0287630 A1も参照されたい。EP 0463151 B1、WO 94/02602、WO 96/34096、およびWO 98/24893もまた、参照されたい。

【 0 1 2 4 】

代替のアプローチにおいて、他の研究者らは、「ミニ遺伝子座」アプローチを利用した。ミニ遺伝子座アプローチにおいて、外因性Ig遺伝子座は、Ig遺伝子座に由来する細片(20
個々の遺伝子)を含めることによって模倣される。したがって、1つまたは複数のVH遺伝子、1つまたは複数のDH遺伝子、1つまたは複数のJH遺伝子、 μ 定常領域、および第2の定常領域(好ましくは 定常領域)が、動物に挿入するための構築物に形成される。このアプローチは、例えば、US 5,545,807、同5,545,806、同5,625,825、同5,625,126、同5,633,425、同5,661,016、同5,770,429、同5,789,650、同5,814,318、同5,591,669、同5,612,205、同5,721,367、同5,789,215、および同5,643,763に記載されている。また、その開示内容の全体が参照により本明細書に組み入れられる、US 5,569,825、同5,877,397、同6,300,129、同5,874,299、同6,255,458、および同7,041,871も参照されたい。また、EP 0546073、WO 92/03918、WO 92/22645、WO 92/22647、WO 92/22670、WO 93/12227、WO 94/00569、WO 94/25585、WO 96/14436、WO 97/13852、およびWO 98/24884も参照されたい。Taylor e 30
t al. (1992 Nuc. Acids. Res., 20:6287)、Chen et al. (1993 Int. Immunol. 5:647)、Tuaille et al. (1993 PNAS USA. 90:3720-4)、Choi et al., (1993 Nature Genetics 4:117)、Lonberg et al. (1994 Nature 368:856-859)、Taylor et al. (1994 International Immunology 6:579-591)、ならびにTuaille et al. (1995 J Immunol. 154:6453-65)、Fishwild et al. (1996 Nature Biotechnology 14:845)、およびTuaille et al. (2000 Eur J Immunol. 10:2998-3005)をさらに参照されたい。

【 0 1 2 5 】

本発明のより具体的な態様において、完全ヒト抗体は、インビトロで抗原刺激したヒト脾細胞を用いて調製される(Boerner et al. 1991. J. Immunol. 147:86-95)。

【 0 1 2 6 】

本発明のより具体的な態様において、完全ヒト抗体は、レパートリークローニングによって調製される(Persson et al. 1991. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:2432-2436; Huan 40
gおよびStollar 1991. J. Immunol. Methods 141:227-236)。さらに、US 5,798,230では、ヒトB細胞からのヒトモノクローナル抗体の調製を説明しており、その際、エプスタイン・バー(Epstein-Barr)ウイルス、または不死化に必要とされるタンパク質であるエプスタイン・バーウイルス核抗原 2 (「EBNA2」)を発現するその派生物に感染させることによってヒト抗体産生B細胞が不死化される。続いて、EBNA2機能は停止され、結果として抗体産生が増加する。

【 0 1 2 7 】

完全ヒト抗体を作製するための他の方法は、不活性化された内因性Ig遺伝子座を有し、 50

再配列されていないヒト抗体重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子に関してトランスジェニックである非ヒト動物の使用を伴う。このようなトランスジェニック動物は、活性化したT細胞またはD1.1タンパク質で免疫化することができ(US 5,474,771;同6,331,433;および同6,455,044)、それらに由来するB細胞からハイブリドーマを作製することができる。これらの方法の詳細は、当技術分野において説明されている。例えば、US 5,789,650を含む、ヒトIgミニ遺伝子座を含むトランスジェニックマウスに関する様々な刊行物/特許;US 6,075,181;同6,150,584;および同6,162,963;Green, 1997, Nature Genetics 7:13-21; Mendez, 1997, Nature Genetics 15:146-56を含む、XENOMOUSE(登録商標)マウスに関する様々な刊行物/特許;ならびにEP843961およびTomizuka, 1997, Nature Genetics 16:1433-43を含む、「トランソミック(transomic)」マウスに関する様々な刊行物/特許を参照されたい。

10

【0128】

本発明のCD154結合タンパク質および抗CD154抗体はまた、交差ブロッキング結合タンパク質もしくは抗体、または、本明細書において説明する抗体のいずれかと同じエピトープに結合するか、もしくは密接に関連したエピトープもしくは共通の部分があるエピトープに結合する結合タンパク質もしくは抗体にも関する。交差ブロッキング結合タンパク質または抗体は、本明細書において説明する抗体のいずれかの結合を競合的に阻害するか、または妨害することができる。特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 12またはSEQ ID NO: 13に記載の重鎖配列を含み、かつSEQ ID NO: 15記載の軽鎖配列を含む(342のFab断片およびFab'断片を含む)ヒト化抗体が結合するのと同じエピトープに結合し、かつ、本明細書において説明するように、抗CD154抗体5c8を用いた競合アッセイ法において同様のCD154結合特性を示す、CD154結合タンパク質および抗CD154抗体を提供する。他の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 58記載のV_Lドメイン配列およびSEQ ID NO: 60記載のV_Hドメイン配列(338抗体の可変配列)を含むヒト化抗体が結合するのと同じエピトープに結合し、かつ、本明細書において説明するように、抗CD154抗体5c8を用いた競合アッセイ法において同様のCD154結合特性を示す、CD154結合タンパク質および抗CD154抗体を提供する。

20

【0129】

本発明の特定の態様において、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、ヒトCD154に対して高親和性を示す。例えば、特定の態様において、CD154結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴(例えば、Biacore(登録商標))によって決定された場合、50nM~1pM(両端の数値を含む)の範囲のK_DでヒトCD154(ヒトCD40L)から解離する。例えば、ヒトCD154に対するK_Dは、25nM~1pM、10nM~1pM、5nM~1pM、1nM~1pM、0.5nM~1pM、0.1nM~1pM、75pM~1pM、50pM~1pM、20pM~1pM、またはさらに10pM~1pMでよい。他の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴(例えば、Biacore(登録商標))によって決定された場合、500pM~1pM(両端の数値を含む)の範囲のK_DでヒトCD154から解離する。いくつかの態様において、ヒトCD154に対するK_Dは、50pM未満である。例えば、本発明のいくつかの態様において、CD154結合タンパク質は、20pM未満のK_DでヒトCD154から解離し、本発明のいくつかの態様において、CD154結合タンパク質は、10pM未満のK_DでヒトCD154から解離する。特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、高い親和性でCD154に結合するが、結合されたCD154をCD40から移動させない。抗体親和性は、当技術分野において公知の方法によって増強することができる(例えば、構造に基づくコンピューター設計を用いた抗体の親和性増強を説明しているClark et al. 2006 Protein Sci. 15(5):949-60、および酵母表面ディスプレイを用いて所望の特性を有するscFvを単離し、人工的に作り出す方法を説明しているChao et al. 2006 Nat Protoc 1:755-768を参照されたい)。

30

40

【0130】

前述の1つまたは複数のCDRを含む本発明の抗体の親和性を改善することが望ましい場合、改善された親和性を有するこのような抗体は、いくつかの親和性成熟プロトコールを用いて得ることができ、プロトコールには、CDRの維持(Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995)、チェーンシャッフリング(Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-78

50

3, 1992)、大腸菌の変異株の使用(Low et al., J. Mol. Biol., 250, 350-368, 1996)、DNAシャッフリング(Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997)、ファージディスプレイ(Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 7-88, 1996)、および性的(sexual)PCR(Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998)が含まれるがそれらに限定されるわけではない。親和性成熟に関するこれらの方法すべてが、Vaughan et al. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998)によって考察されている。したがって、本発明はまた、CD154に特異的に結合する本発明の抗体の配列変種も提供する。このような配列変種は、配列内に1つまたは複数の半保存的置換または保存的置換を含み、このような置換は、好ましくは、ポリペプチドの所望の活性に有意に影響を及ぼさない。置換は天然に存在してよく、または、例えば変異誘発を用いて(例えば、Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551)導入してもよい。例えば、アミノ酸のグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンは、しばしば互いに置換され得る(脂肪族側鎖を有するアミノ酸)。これらの起こり得る置換のうちで、グリシンおよびアラニンが互いを置換するのに使用されること(これらは比較的短い側鎖を有するため)、ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンが互いを置換するのに使用されること(これらはより大きな疎水性の脂肪族側鎖を有するため)が好ましい。しばしば互いに置換され得る他のアミノ酸には非限定的に以下が含まれる:

- フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン(芳香族側鎖を有するアミノ酸);
- リジン、アルギニン、およびヒスチジン(塩基性側鎖を有するアミノ酸);
- アスパラギン酸およびグルタミン酸(酸性側鎖を有するアミノ酸);
- アスパラギンおよびグルタミン(アミド側鎖を有するアミノ酸);ならびに
- システインおよびメチオニン(硫黄を含む側鎖を有するアミノ酸)。

【0131】

また、本発明のCD154結合タンパク質、例えば、抗CD154抗体の結合親和性は、相対的な用語で、または同様にCD154に特異的に結合する第2の抗体(例えば、本明細書において「第2のCD154特異的抗体」と呼ばれる場合がある、CD154特異的な第2の抗CD154抗体)の結合親和性と比較して、説明され得る。いくつかの態様において、第2のCD154特異的抗体は、抗体5c8(US 5,474,771に記載されているように、アクセッション番号HB10916でATCCに寄託されているハイブリドーマによって産生される)またはヒト化5c8でよい。他の態様において、第2のCD154特異的抗体は、342、381、338、294、295、300、335、303、または402(図12)などの本発明の抗体のいずれかでよい。したがって、本発明の特定の態様は、抗体5c8よりも大きな親和力で、または抗体5c8の K_D よりも小さい K_D でヒトCD154に結合する抗CD154抗体に関する。また、特定の態様において、本発明の抗CD154抗体の方が、等モル濃度の5c8のような第2のCD154特異的抗体よりも、CD154活性を阻害するか、またはCD154:CD40相互作用を妨害する程度が大きい。抗CD154抗体がCD154:CD40相互作用を妨害する相対的能力は、例えば、本明細書において説明するICAM-1上方制御アッセイ法および競合結合アッセイ法など任意の利用可能なアッセイ法によって測定することができる。

【0132】

したがって、特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質および抗CD154抗体(抗体断片および抗体誘導体を含む)は、CD40へのCD154の結合を阻害するために有用であり、高い特異性で、例えば、10pM~1.5 μ M(両端の数値を含む)の範囲のIC50でこれを行う。特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗体は、10pM~500pM、50pM~500pM、100pM~500pM、250pM~750pM、500pM~1 μ M、または750pM~1.5 μ Mの範囲のIC50を有してよい。さらなる態様において、抗CD154抗体は、CD40活性を刺激(agonize)することも、CD40シグナル伝達を活性化することも実質的にしない。いくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体は、CD154もしくはCD40または両方の活性に拮抗する。

【0133】

したがって、本発明の特定の態様は、第2のCD154特異的抗体(例えば、抗体5c8もしくはヒト化5c8)と比べて大きな親和力もしくは等しい親和力で、または第2のCD154特異的抗体の K_D より小さい K_D もしくは等しい K_D でヒトCD154に結合するCD154結合タンパク質および抗

10

20

30

40

50

CD154抗体に関し、ここで、抗CD154抗体は、第2のCD154特異的抗体と比べて、CD154:CD40相互作用を実質的に阻害しない。このような抗体は、例えば、結合アッセイ法および診断用の反応物として有用であり得る。ヒトCD154に対して高親和性を示すが、第2のCD154特異的抗体と比べて程度の低いCD154:CD40阻害を示す例示的な抗体は、本明細書において説明する抗体381および抗体338である。例えば、本発明は、(例えばヒト化5c8のような第2のCD154特異的抗体と比べて)大きな親和力または等しい親和力でヒトCD154に特異的に結合するが、第2のCD154特異的抗体よりも低い程度でCD154:CD40相互作用を妨害する抗CD154抗体を提供する。さらなる態様において、CD40へのCD154(CD40L)の結合を第2のCD154特異的抗体よりも低い程度で阻害するこれらの抗CD154抗体はまた、CD40活性を刺激(agonize)することも、CD40シグナル伝達を活性化することも実質的にしない。例えば、このような抗体は、実施例7で説明するようなインビトロの力価アッセイ法において投与された場合、対照処置を上回る統計学的に有意な刺激(agonization)をまったく示さない場合があるか、または陽性対照(例えばCD154リガンド)と比べて1%、2%、3%、5%、もしくは10%の刺激(agonization)を示す場合がある。Vidalain et al. (The EMBO Journal (2000) 19:3304-3313)およびPearson et al. (International Immunology (2001) 13:273-283)では、CD40シグナル伝達経路を説明しており、また、CD154:CD40相互作用が妨害または阻害されているか否か、およびどの程度までであるかを判定するために使用できるアッセイ法も提供する。

10

【0134】

いくつかの態様において、本発明は、CDR-H1(SEQ ID NO: 3)、CDR-H2(SEQ ID NO: 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 5)より選択される少なくとも1つのCDRを含む抗CD154抗体に関する。好ましくは、抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 3)、CDR-H2(SEQ ID NO: 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 5)より選択される少なくとも2つのCDR、ならびにより好ましくは、これらのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3の3つすべてを含む。

20

【0135】

別の態様において、本発明の抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 6)、CDR-L2(SEQ ID NO: 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 8)より選択される少なくとも1つのCDRを含む。好ましくは、抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 6)、CDR-L2(SEQ ID NO: 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 8)より選択される少なくとも2つのCDR、ならびにより好ましくは、これらのCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の3つすべてを含む。

30

【0136】

さらなる態様において、抗体は、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 3~5)の3つすべてならびにCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 6~8)の3つすべてを含む。

【0137】

さらなる態様において、抗CD154抗体は、SEQ ID NO: 1、9、10、または11のいずれか1つに記載の可変重鎖配列およびSEQ ID NO: 2または14に記載の可変軽鎖配列を含む。

【0138】

いくつかの態様において、本発明は、CDR-H1(SEQ ID NO: 42)、CDR-H2(SEQ ID NO: 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 44)より選択される少なくとも1つのCDRを含む抗CD154抗体に関する。好ましくは、抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO: 42)、CDR-H2(SEQ ID NO: 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 44)より選択される少なくとも2つのCDR、ならびにより好ましくは、これらのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3の3つすべてを含む。

40

【0139】

別の態様において、本発明の抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 45)、CDR-L2(SEQ ID NO: 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 47)より選択される少なくとも1つのCDRを含む。好ましくは、抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO: 45)、CDR-L2(SEQ ID NO: 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO: 47)より選択される少なくとも2つのCDR、ならびにより好ましくは、これらのCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の3つすべてを含む。

【0140】

さらなる態様において、抗体は、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3(SEQ ID NO: 42~44)

50

の3つすべてならびにCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 45 ~ 47)の3つすべてを含む。

【 0 1 4 1 】

さらなる態様において、抗CD154抗体は、SEQ ID NO : 56に記載の可変重鎖配列を含み、かつ/またはSEQ ID NO : 54に記載の可変軽鎖配列を含む。

【 0 1 4 2 】

いくつかの態様において、本発明は、CDR-H1(SEQ ID NO : 48)、CDR-H2(SEQ ID NO : 49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 50)より選択される少なくとも1つのCDRを含む抗CD154抗体に関する。好ましくは、抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO : 48)、CDR-H2(SEQ ID NO : 49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 50)より選択される少なくとも2つのCDR、ならびにより好ましくは、これらのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3の3つすべてを含む。

10

【 0 1 4 3 】

別の態様において、本発明の抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 51)、CDR-L2(SEQ ID NO : 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 53)より選択される少なくとも1つのCDRを含む。好ましくは、抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 51)、CDR-L2(SEQ ID NO : 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 53)より選択される少なくとも2つのCDR、ならびにより好ましくは、これらのCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の3つすべてを含む。

【 0 1 4 4 】

特定の態様において、抗体は、上記のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3のうち1つもしくは複数の軽鎖CDRを含む相補的配列、または1つもしくは複数の重鎖CDRすなわち上記のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む相補的配列をそれぞれ有する。したがって、特定の態様において、本発明の抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO : 48)、CDR-H2(SEQ ID NO : 49)、またはCDR-H3(SEQ ID NO : 50)、およびCDR-L1(SEQ ID NO : 51)、CDR-L2(SEQ ID NO : 52)、またはCDR-L3(SEQ ID NO : 53)を含む。

20

【 0 1 4 5 】

さらなる態様において、抗体は、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 48 ~ 50)の3つすべてならびにCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 51 ~ 53)の3つすべてを含む。

【 0 1 4 6 】

さらなる態様において、抗CD154抗体は、SEQ ID NO : 60に記載の可変重鎖配列を含み、かつ/またはSEQ ID NO : 58に記載の可変軽鎖配列を含む。

30

【 0 1 4 7 】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、SEQ ID NO : 62に記載の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 65に記載の重鎖配列を含む。他の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、SEQ ID NO : 63に記載の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 66に記載の重鎖配列を含む。

【 0 1 4 8 】

特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、SEQ ID NO : 68に記載の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 71に記載の重鎖配列を含む。他の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、SEQ ID NO : 69に記載の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 72に記載の重鎖配列を含む。他の態様において、CD154結合タンパク質は、SEQ ID NO : 68、SEQ ID NO : 69、SEQ ID NO : 71、またはSEQ ID NO : 72に記載の配列のうち1つを含む。

40

【 0 1 4 9 】

本発明はまた、本発明のCD154結合タンパク質と少なくとも90%、91%、92%、93%、または94%の同一性を好ましくは共有するCD154結合タンパク質も提供する。より好ましくは、CD154結合タンパク質は、少なくとも95%、96%、97%、または98%の同一性を共有する。より好ましくは、CD154結合タンパク質は、本発明のCD154結合タンパク質と少なくとも99%、99.5%、99.9%、またはそれ以上の同一性を共有する。本発明のCD154結合タンパク質は、

SEQ ID NO: 1,
 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14,
 SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO:
 58 もしくは SEQ ID NO: 60

の可変ドメインと少なくとも85%同一である可変ドメイン配列またはそれらの1つもしくは複数のCDRを含んでよい。

【0150】

本発明の他の態様は、二重特異性抗体に関する。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体である。これらは、単独で使用してよく、または混合してポリクローナル集団を含む組成物にしてもよい。本発明において、結合特異性のうち一方はCD154抗原に対するのに対し、他方の結合特異性は、他の任意の抗原、および好ましくは細胞表面タンパク質またはレセプターもしくはレセプターサブユニットに対する。例えば、他方の結合特異性は、ヒト血清アルブミン(HSA)、TNF、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、IFN-、CD2、CD4、CD8、CTLA4、LFA1、LFA3、およびVLA4より選択されるリガンドでよい。

10

【0151】

本発明の他の態様において、抗CD154抗体は、一般的リガンド結合部位を含む。一般的リガンド(例えばポリペプチド)は、標的リガンドの特異性に関わらず、あるレポーターの機能的メンバーに結合することができる。したがって、一般的リガンドを用いて、あるレポーター(抗体の集団またはグループなど。抗体の抗原結合特異性に関わらない)の機能的メンバーを(例えば、精製プロセスおよびスクリーニングプロセスにおいて)同定または選択することができる。一般的リガンドには、例えば、プロテインA、プロテインG、およびプロテインLが含まれる。一般的リガンドを用いたファージライブラリーのメンバーの予備選択はWO 99/20749において教示されている。

20

【0152】

抗体断片

本発明はまた、抗原に結合する抗CD154抗体断片またはエピトープに結合する抗CD154抗体断片にも関する。抗CD154抗体に関して前述した方法および反応物はすべて、本発明の抗CD154抗体断片を作製および使用するために同様に使用することができる。

30

【0153】

本発明のいくつかの態様において、抗CD154抗体断片には、ヘテロマー抗体複合体および抗体融合物、例えば、二重特異性抗体、ヘミ二量体抗体、多価抗体(すなわち、四価の抗体)、および単鎖抗体が含まれる。ヘミ二量体抗体は、Fc部分および1つのFab部分から構成される。単鎖抗体は、単一のタンパク質鎖中でタンパク質スパーサーによって連結された可変領域から構成される。

【0154】

本発明のいくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体断片にはまた、1つまたは複数の免疫グロブリン軽鎖および/または重鎖を含むタンパク質、例えば、これらの鎖の単量体およびホモ多量体またはヘテロ多量体(例えば、二量体または三量体)(これらの鎖は、任意でジスルフィド結合されているか、または別の方法で架橋されている)が含まれ得る。これらの抗体は、1つまたは複数の抗原に結合することができる。

40

【0155】

特定の態様において、本発明は、Fab、F(ab)₂、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、F(v)、Fd、dAb、ダイアボディ、ミニボディ、およびナノボディの抗体断片など、全抗体の抗原結合断片を含む。本発明はまた、V_HドメインもしくはV_Lドメインなど単一の可変ドメインのみを含む断片、または重鎖ドメインもしくは軽鎖ドメインのみを含む断片にも関する。これらの断片は、ヒト化されているか、または完全にヒト由来でよい。本発明はまた、代替の骨

50

格から作られている抗原結合断片(例えば、Binz、前記およびHosse、前記を参照されたい)または普遍的なフレームワークを含む抗原結合断片も含む。本発明はまた、例えばキャリアタンパク質またはPEGなどの機能的部分に共有結合的もしくは非共有結合的に、または直接的もしくは間接的に結合された、CD154に特異的に結合する任意の抗原結合断片またはCD154結合タンパク質を含む結合体にも関する。

【 0 1 5 6 】

本発明の抗CD154抗体には、二価の抗体が含まれる。したがって、特定の態様において、本発明は、共有結合された2つの抗体重鎖および少なくとも1つのポリマー分子を含む二価の抗CD154抗体断片に関し、各重鎖は一方の鎖のシステイン残基の硫黄原子を他方の鎖のシステイン残基の硫黄原子に連結する少なくとも1つの非ジスルフィド鎖間架橋によって他方と共有結合的に連結されており、システイン残基は、各鎖の可変領域ドメインの外側に位置しており、少なくとも1つの非ジスルフィド鎖間架橋が、共有結合的に連結されたポリマー分子を含むことを特徴とする。本明細書において使用される「非ジスルフィド」という用語は、例えば、抗体中に通常存在するタイプのS-S架橋が除外されることを意味すると意図される。しかしながら、本発明による断片中に存在するタイプの鎖間架橋は、本明細書において後述するように-S-S-結合によって重鎖に依然として連結されている。一般に、本発明による二価抗体断片中の各ポリマー分子は、鎖間架橋の一部を形成する。各架橋は、2つの重鎖を連結するのに役立ち、各鎖において、システイン残基の硫黄原子に共有結合的に連結される。共有結合は、一般に、ジスルフィド結合、または特定の態様において、硫黄-炭素結合である。例示的な二価の抗体構造物に関しては、WO 99/64460およびWO 05/061005を参照されたい。

10

20

【 0 1 5 7 】

本発明はまた、一価の抗体または一価の抗原結合断片である抗CD154抗体も提供する。本明細書において使用される場合、「一価の」という用語は、所与の抗体または抗原結合断片(例えば、Fv、単鎖scFv、dAb、Fab、Fab'、Fd、scFab、scFab Cなど)が、その標的の単一分子にのみ結合できることを意味する。天然に存在する抗体は、 V_H ドメインおよび V_L ドメインをそれぞれ含む2つの機能的抗原結合アームを有するので、一般に二価である。二価の抗体は、立体障害が問題とならない場合、同じ抗原の2つの別々の分子に結合できる。一方、「一価の」抗体は、標的に対して1つの抗原結合部位を有する。一価の抗体の抗原結合ドメインは、 V_H ドメインおよび V_L ドメインを含んでよいが、または、それぞれ対応する V_L ドメインも V_H ドメインも必要とせずにCD154に結合する能力を有する、単一の免疫グロブリン可変ドメインのみ、すなわち V_H ドメインまたは V_L ドメインを含んでよい。このような例示的な一価の抗体は、単一の免疫グロブリン可変ドメインを含み、1つのCD154抗原分子にのみ結合できるFd断片である。一価の抗体は、単一の抗原の分子を架橋する能力を欠いている。

30

【 0 1 5 8 】

本発明は、SEQ ID NO : 12またはSEQ ID NO : 13にそれぞれ記載の重鎖配列およびSEQ ID NO : 15に記載の軽鎖配列を有するヒト化Fab断片またはヒト化Fab'断片が特異的に結合するエピトープに特異的に結合する、抗CD154抗体を提供する。特定の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO : 1、9、10、または11に記載の可変重鎖配列およびSEQ ID NO : 2またはSEQ ID NO : 14に記載の可変軽鎖配列を有する抗体断片である。他の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO : 12またはSEQ ID NO : 13に記載の重鎖配列およびSEQ ID NO : 15に記載の軽鎖配列を有する抗体断片である。

40

【 0 1 5 9 】

特定の態様において、CD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 13の重鎖配列を含むか、またはそれらからなる。特定の態様において、CD154結合タンパク質または抗体は、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 12の重鎖配列を含むか、またはそれらからなる。

【 0 1 6 0 】

代替の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 56に記載の可変重鎖配列を含み、かつSEQ

50

ID NO : 54に記載の可変軽鎖配列を含む抗体断片を提供する。他の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO : 60に記載の可変重鎖配列を含み、かつSEQ ID NO : 58に記載の可変軽鎖配列を含む抗体断片である。

【0161】

1つの態様において、本発明は、CD154に特異的に結合するFab'断片またはF(ab')₂断片もしくはF(ab')₃断片を提供する。このFab'断片またはF(ab')₂断片もしくはF(ab')₃断片は、ヒト化されてよく、SEQ ID NO : 13の配列を含むか、またはそれからなる重鎖配列を有してよく、かつ、SEQ ID NO : 15の配列を含むか、またはそれからなる軽鎖配列を有してよい。

【0162】

いくつかの態様において、本発明は、Fcドメインを含まない抗CD154抗体に関する。このようなFcを欠損した抗体または断片は、一価、二価、またはさらに多価でよい。

【0163】

本発明はまた、前述のFab'断片またはF(ab')₂断片もしくはF(ab')₃断片が特異的に結合するエピトープに特異的に結合する抗体または抗体断片も提供する。これらの抗体または抗体断片は、本明細書において説明する(実施例9)交差ブロッキングアッセイ法によって同定することができる。これらの抗体または抗体断片は、単離されるか、組換え、または合成でよく、かつ、第2の分子に結合させて抗体結合体を形成させることができる。

【0164】

低いエフェクター機能を有する抗体

抗体および抗体-抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用は、本明細書においてエフェクター機能と呼ぶ様々な応答を引き起こす。IgG抗体は、細胞表面Fcレセプターファミリーのメンバーおよび補体系のC1qに結合することによって、免疫系のエフェクター経路を活性化する。集められた抗体によるエフェクタータンパク質の連結が、炎症性サイトカインの放出、抗原産生の調節、エンドサイトーシス、および細胞死滅を含む様々な応答を引き起こす。いくつかの臨床応用において、これらの応答は、モノクローナル抗体の有効性のために非常に重要である。他の応用において、これらは、炎症および抗原を有する細胞の排除などの望まれない副作用を誘発する。したがって、本発明はさらに、変化した、例えば低いエフェクター機能を有する、抗体を含むCD154結合タンパク質に関する。重要なことには、低いエフェクター機能は、抗CD154抗体がCD154-CD40相互作用を妨害することによって1つまたは複数の疾患を抑制する能力を必ずしも低下させない(その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 05/03175を参照されたい)。

【0165】

減弱したエフェクター機能(例えば、Fcを媒介としたエフェクター機能;下記を参照されたい)を有する抗CD154抗体は、望ましくない血栓塞栓活性の可能性が存在する対象において使用するのに特に望ましい。さらに、抗CD154抗体の減弱したエフェクター機能により、活性化T細胞およびCD154を発現するように誘導された他の細胞集団の消失または単球/マクロファージのFc依存性活性化など抗CD154抗体療法の他の望まれない潜在的副作用が減少するか、または解消され得る。

【0166】

本発明の抗CD154抗体のエフェクター機能は、多くの公知のアッセイ法の中の1つを用いて決定することができる。抗CD154抗体のエフェクター機能は、第2の抗CD154抗体と比べて低くてよい。いくつかの態様において、第2の抗CD154抗体は、CD154に特異的に結合する任意の抗体でよい。いくつかの態様において、第2の抗CD154抗体は、抗体5c8(US 5,474,771において説明されているように、ATCCアクセッション番号HB10916で寄託されたハイブリドーマによって産生された)またはヒト化5c8でよい。他の態様において、第2のCD154特異的抗体は、342、381、338、294、295、300、335、303、または402(図12)などの本発明の抗体のいずれかでよい。他の態様において、関心対象の抗CD154抗体が、エフェクター機能を低下させるように修飾されている場合、第2の抗CD154抗体は、その抗体の未修飾型または親型でよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 7 】

本発明の抗CD154抗体のエフェクター機能はまた、例えば、抗CD154抗体での処理によって引き起こされる血小板の凝集または活性化のレベルを対照抗体と比べて測定することによって、決定することもできる。したがって、いくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体は、標準的な血小板の凝集または活性化のアッセイ法において血小板の凝集または活性化を媒介もせず、促進もしない。他の態様において、抗CD154抗体は、第2の抗CD154抗体(例えば、5c8またはヒト化5c8)と比べて、より低いレベルの血小板の凝集または活性化を媒介する。

【 0 1 6 8 】

例示的なエフェクター機能には、Fcレセプター結合、食作用、アポトーシス、炎症誘発性応答、細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター;BCR)の下方制御などが含まれる。他のエフェクター機能には、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)(抗体が細胞障害性T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、またはマクロファージ上のFcレセプターに結合して、細胞死をもたらす)および補体依存性細胞障害(CDC)(補体カスケードの活性化によって誘導される細胞死である)が含まれる(Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997); WardおよびGhetie, *Therapeutic Immunol.* 2:77-94 (1995);ならびにRavetchおよびKinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)に総説がある)。このようなエフェクター機能は一般に、Fc領域が結合ドメイン(例えば抗体可変ドメイン)と結合されることを必要とし、当技術分野において公知である標準的なアッセイ法を用いて評価することができる(例えば、WO 05/018572、WO 05/003175、およびUS 6,242,195を参照されたい)。

【 0 1 6 9 】

エフェクター機能は、Fcドメインを欠いている抗体断片、例えばFab、Fab'2、または単鎖Fvを用いることによって無効にすることができる。代替方法は、Fc RIに結合するが、C1qならびにFc RIIおよびFc RIIIに十分に結合しないIgG4サブタイプ抗体を使用することであった。IgG2サブタイプもまた、Fcレセプターへの結合が少ないが、Fc RIIaのH131アロタイプおよびC1qへの有意な結合を保持している。したがって、すべてのFcレセプターおよびC1qへの結合を無くすには、Fc配列のさらなる変更が必要とされる。

【 0 1 7 0 】

ADCCを含むいくつかの抗体エフェクター機能は、抗体のFc領域に結合するFcレセプター(FcR)によって媒介される。特定のFcRに対する抗体の親和性、およびその結果、その抗体によって媒介されるエフェクター活性は、抗体のFc領域および/または定常領域のアミノ酸配列および/または翻訳後修飾を改変することによって調整することができる。

【 0 1 7 1 】

FcRは、免疫グロブリンのアイソタイプに対する特異性に基づいて定義される。IgG抗体に対するFcレセプターはFc Rと呼ばれ、IgEに対するFc R、IgAに対するFc Rなどがある。3つのサブクラスのFc Rが同定されている:Fc RI(CD64)、Fc RII(CD32)、およびFc RIII(CD16)。Fc RIIおよびFc RIIIの両方とも、2つのタイプを有する:Fc RIIA(CD32)およびFc RIIB(CD32);ならびにFc RIIIA(CD16a)およびFc RIIB(CD16b)。各Fc Rサブクラスは2つまたは3つの遺伝子にコードされており、選択的RNAプライシングによって複数の転写物が生じるため、Fc Rアイソフォームの幅広い多様性が存在する。例えば、Fc RII(CD32)には、IIa、IIb1、IIb2 IIb3、およびIIcが含まれる。

【 0 1 7 2 】

Fc Rに対するヒト抗体およびマウス抗体上の結合部位は、残基233~239(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)、Woof et al. *Molec. Immunol.* 23:319-330 (1986); Duncan et al. *Nature* 332:563 (1988); CanfieldおよびMorrison, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491 (1991); Chappel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:9036-9040 (1991)におけるEU指針の番号付与)からなるいわゆる「下側ヒンジ領域」に以前にマッピングされている。残基233~239のうちで、結合におそらく関与しているものとして挙げられるものには、P238およびS239がある。Fc Rへの結合におそらく関与して

10

20

30

40

50

いる、以前に挙げられている他の領域は次のとおりである：ヒトFc RIに対するG316~K338(ヒトIgG)(配列比較のみによる;置換変異体は評価されなかった)(Woof et al. *Molec Immunol.* 23:319-330 (1986));ヒトFc RIIIに対するK274~R301(ヒトIgG1)(ペプチドに基づく)(Sarmay et al. *Molec. Immunol.* 21:43-51 (1984));およびヒトFc RIIIに対するY407~R416(ヒトIgG)(ペプチドに基づく)(Gergely et al. *Biochem. Soc. Trans.* 12:739-743 (1984)およびShields et al. *J Biol Chem* 276:6591-6604 (2001)、Lazar GA et al. *Proc Natl Acad Sci* 103:4005-4010 (2006))。FcR結合に関与しているアミノ酸残基のこれらおよび他のストレッチまたは領域は、Ig-FcR複合体の結晶構造の検査により、当業者には明らかであり得る(例えば、Sondermann et al. 2000 *Nature* 406(6793):267-73およびSondermann et al. 2002 *Biochem Soc Trans.*30(4):481-6を参照されたい)。したがって、本発明の抗CD154抗体は、1つまたは複数の前述の残基の修飾を含む。

10

【0173】

mAbエフェクター機能を低下させるための他の公知のアプローチには、エフェクター結合相互作用に関与しているmAb表面のアミノ酸を変異させること(Lund, J., et al. (1991) *J. Immunol.* 147(8):2657-62; Shields, R. L. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276(9):6591-604)、ならびに異なるサブタイプの配列セグメントの組合せ(例えば、IgG2およびIgG4の組合せ)を用いて、いずれかのサブタイプ単独の場合よりもFc レセプターへの結合を大きく低下させること(Armour et al., *Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-1624; *Mol. Immunol.* 40 (2003) 585-593)が含まれる。

【0174】

一部またはすべてのFcレセプターサブタイプに対する親和性が変化および/または低下した(およびしたがって、エフェクター機能に関する)多数のFc変種が当技術分野において公知である。例えば、US 2007/0224188;US 2007/0148171;US 2007/0048300;US 2007/0041966;US 2007/0009523;US 2007/0036799;US 2006/0275283;US 2006/0235208;US 2006/0193856;US 2006/0160996;US 2006/0134105;US 2006/0024298;US 2005/0244403;US 2005/0233382;US 2005/0215768;US 2005/0118174;US 2005/0054832;US 2004/0228856;US 2004/132101;US 2003/158389を参照されたい。また、US 7,183,387;同6,737,056;同6,538,124;同6,528,624;同6,194,551;同5,624,821;同5,648,260も参照されたい。

20

【0175】

CDCにおいて、抗体-抗原複合体は補体に結合し、結果として、補体カスケードの活性化および膜攻撃複合体の生成が起こる。古典的補体経路の活性化は、同族抗原に結合された(適切なサブクラスの)抗体に補体系の第1の成分(C1q)が結合することによって開始される。したがって、補体カスケードの活性化は、C1qタンパク質への免疫グロブリンの結合親和性によって部分的に調節される。補体カスケードを活性化するには、抗原性標的に結合されたIgG1、IgG2、またはIgG3のうち少なくとも2つの分子(ただしIgMの1つの分子のみ)にC1qが結合することが必要である(WardおよびGhetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995) 80頁)。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)において説明されているCDCアッセイ法を実施してもよい。

30

【0176】

IgG分子の様々な残基がC1qへの結合に関与していることが提唱されており、これらには、CH2ドメイン上のGlu318残基、Lys320残基、およびLys322残基、同じ鎖に極めて近いターン上に位置するアミノ酸残基331、下側ヒンジ領域に位置するLys235残基およびGly237残基、ならびにCH2ドメインのN末端領域に位置する残基231~238が含まれる(例えば、Xu et al., *J. Immunol.* 150:152A (要約) (1993)、W094/29351; Tao et al, *J. Exp. Med.*, 178:661-667 (1993);Brekke et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:2542-47 (1994);Burton et al,*Nature*, 288:338-344 (1980);DuncanおよびWinter, *Nature* 332:738-40 (1988);Ilduogio et al *Immunol* 164:4178-4184 (2000);US 5,648,260およびUS 5,624,821を参照されたい)。IgG1における例として、ヒトIgG1のCH2ドメインのCOOH末端領域中の2つの変異、すなわちK322AおよびP329Aは、CDC経路を活性化せず、C1q結合を100分の1未満に低下さ

40

50

せることが示された(US 6,242,195)。

【0177】

したがって、本発明の特定の態様において、本明細書において提供するCD154抗体のCDC活性を低下させるために、1つもしくは複数のこれらの残基を修飾、置換、もしくは除去してよい、または1つもしくは複数のアミノ酸残基を挿入してよい。例えば、いくつかの態様において、免疫応答をさらに活性化する可能性を低下させるか、または排除するために、本抗体のエフェクター機能を低下させるか、または排除することが望ましい場合がある。また、低いエフェクター機能を有する抗体は、抗体を与えられている対象における血栓塞栓性事象のリスクを低下させ得る。

【0178】

他の特定の態様において、本発明は、1つまたは複数のFcRレセプターに対して少ない結合を示すが、(例えば、天然抗CD154抗体、非変種抗CD154抗体、または親抗CD154抗体と同様の程度で、またはいくつかの態様において、これらより低い程度で)補体に結合する能力を維持している抗CD154抗体を提供する。したがって、本発明の抗CD154抗体は、FcR、例えばFc RIIa(例えば、血小板上で発現されるFc RIIa)への結合の減少を示しつつ、補体に結合し、それを活性化し得る。Fc RIIa(例えば、血小板上で発現されるFc RIIa)への結合が減少しているか、または無いが、C1qに結合し、少なくともある程度まで補体カスケードを活性化できるこのような抗体は、望ましいエフェクター機能をおそらく維持しつつ、血栓塞栓性事象のリスクを低下させると考えられる。代替の態様において、本発明の抗CD154抗体は、1つまたは複数のFcRへの結合の減少を示すが、他の1つまたは複数のFcRに結合する能力を維持している。例えば、FcRI、FcRII、および/またはFcRIIIへの結合が減少した抗体を生じる様々なアミノ酸修飾、ならびに1つのFcRへの結合を増加させるが、別のFcRへの結合を減少させるアミノ酸置換を説明するUS 2007-0009523、同2006-0194290、同2005-0233382、同2004-0228856、および同2004-0191244を参照されたい。

【0179】

したがって、抗CD154抗体の定常領域を要するエフェクター機能は、定常領域、および特にFc領域の特性を改変することによって調整することができる。特定の態様において、低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体は、エフェクター機能を有し、かつ、エフェクター機能を媒介する天然の定常領域またはFc領域を含む非変種抗体、天然抗体、または親抗体(例えば、抗体342またはUS 5,474,771に記載されている抗体5c8)でよい第2の抗体と比較される。特定の態様において、エフェクター機能の調整は、活性が無効にされるか、または完全に存在しない状況を含む。

【0180】

天然配列のFc領域または定常領域は、天然に存在するFc領域または定常鎖領域のアミノ酸配列と同一なアミノ酸配列を含む。好ましくは、相対的なエフェクター機能を評価するために使用される対照分子は、試験抗体または変種抗体が含むのと同じタイプ/サブタイプのFc領域を含む。変種のまたは改変されたFc領域または定常領域は、少なくとも1つのアミノ酸修飾(例えば、翻訳後修飾、アミノ酸置換、挿入、または欠失など)が原因で、天然配列の重鎖領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。したがって、変種定常領域は、例えばグリコシル化パターンの変化を含む翻訳後修飾の変化をもたらす、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または挿入を含んでよい。例えば、親抗体または親Fc領域は、変化した、例えば低いエフェクター機能を有する定常領域(すなわちFc)を構築するために使用される、正常なエフェクター機能を有する変種である。

【0181】

エフェクター機能が変化した(例えば、低い、または排除された)抗体は、変種の定常領域、Fc領域、または重鎖領域を有する抗体を人工的に作り出すか、または産生させることによって作製することができる。組換えDNA技術ならびに/または細胞の培養条件および発現条件を用いて、機能および/または活性が変化した抗体を産生させることができる。例えば、組換えDNA技術を用いて、エフェクター機能を含む抗体機能に影響を及ぼす領域(例えば、Fc領域または定常領域など)に1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または挿入を

10

20

30

40

50

人工的に作り出すことができる。あるいは、例えばグリコシル化パターン(下記を参照されたい)のような翻訳後修飾の変更は、抗体が産生される宿主細胞ならびに細胞の培養条件および発現条件を操作することによって実現することもできる。

【0182】

アミノ酸置換のようなアミノ酸改変により、抗原結合親和性に影響を及ぼさずに、本発明の抗CD154抗体のエフェクター機能を改変することができる。例えば、前述のアミノ酸置換(例えば、Glu318、Kys320、Lys332、Lys235、Gly237、K332、およびP329)を用いて、低いエフェクター機能を有する抗体を作製することができる。

【0183】

他の態様において、アミノ酸置換は、次のアミノ酸残基の内の1つまたは複数に対して起こすことができる：重鎖定常領域の234、235、236、237、297、318、320、および322(US 5,624,821およびUS 5,648,260を参照されたい)。このような置換によって、抗原結合活性を保持しつつエフェクター機能を改変することができる。アミノ酸234、235、236、および237のうち1つまたは複数を変更することにより、未修飾抗体または非変種抗体と比べて、Fc RIレセプターに対するFc領域の結合親和性を低下させることができる。アミノ酸残基234、236、および/または237は、例えばアラニンで置換してよく、アミノ酸残基235は、例えばグルタミンで置換してよい。別の態様において、抗CD154 IgG1抗体は、Alaによる234位のLeuの置換、Gluによる235位のLeuの置換、およびAlaによる237位のGlyの置換を含んでよい。

【0184】

さらにまたはあるいは、318、320、および322位のFcアミノ酸残基を改変してもよい。マウスIgGおよびヒトIgGにおいて高度に保存されているこれらのアミノ酸残基は、補体結合を媒介する。これらのアミノ酸残基を改変すると、C1q結合が減少するが、抗原結合にも、プロテインA結合にも、Fcがマウスマクロファージに結合する能力にも影響を及ぼさないことが示されている。

【0185】

別の態様において、本発明の抗CD154抗体は、エフェクター機能を低下させるか、または排除する置換を含む、IgG4免疫グロブリンである。本発明の抗CD154抗体のIgG4 Fc部分は、次の置換の内の1つまたは複数を含んでよい：プロリンによる残基233のグルタミン酸の置換、アラニンまたはバリンによる残基234のフェニルアラニンの置換、およびアラニンまたはグルタミン酸による残基235のロイシンの置換(EU番号付与、Kabat, E. A. et al. (1991)、前記)。さらに、残基297(EU番号付与)のAsnをAlaで置換することによってIgG4 Fc領域のN結合型グリコシル化部位を除去することにより、エフェクター機能をさらに低下させ、かつ、存在し得る任意の残存エフェクター活性を排除することができる。低いエフェクター機能を有する別の例示的なIgG4変異体は、重鎖定常領域中に変異S228PおよびL235E(PE変異)を含むIgG4サブタイプ変種である。この変異は、エフェクター機能の低下をもたらす。US 5,624,821およびUS 5,648,260を参照されたい。エフェクター機能を低下させる、IgG4の状況における別の例示的な変異は、本明細書において説明するようにS228P/T229Aである。

【0186】

定常領域中の他の例示的なアミノ酸配列変化には、Bluestone et al.によって説明されているAla-Ala変異が含まれるがそれに限定されるわけではない(WO 94/28027およびWO 98/47531を参照されたい;また、Xu et al. 2000 Cell Immunol 200;16-26も参照されたい)。したがって、特定の態様において、Ala-Ala変異を含む、定常領域内部の変異を有する抗CD154抗体を用いて、エフェクター機能を低下させるか、または無効にすることができる。これらの態様によれば、抗CD154抗体の定常領域は、234位におけるアラニンへの変異または235位におけるアラニンへの変異を含む。さらに、定常領域は二重変異、すなわち、234位におけるアラニンへの変異および235位におけるアラニンへの第2の変異を含んでもよい。

【0187】

1つの態様において、抗CD154抗体は、Ala-Ala変異が、234位におけるフェニルアラニンからアラニンへの変異および/または235位におけるロイシンからアラニンへの変異を説明すると思われるIgG4フレームワークを含む。別の態様において、抗CD154抗体は、Ala-Ala変異が、234位におけるロイシンからアラニンへの変異および/または235位におけるロイシンからアラニンへの変異を説明すると思われるIgG1フレームワークを含む。あるいはまたはさらに、抗CD154抗体は、CH2ドメイン中の点変異K322Aを含む他の変異を有してもよい(Hezareh et al. 2001 J Virol.75:12161-8)。

【0188】

他の例示的なアミノ酸置換は、抗体がFcRIに結合する能力を改変し、それによって抗体がC1qに結合する能力を低下させ、その結果として抗体が補体を固定する能力を低下させる変異をCH2ドメインのN末端領域中に有する抗体を列挙するWO 94/29351(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)において提供される。FcR結合をより少なくする、IgG2のCH2上側領域の変異を説明するCole et al. (J Immunol. (1997) 159:3613-3621)も参照されたい。

10

【0189】

アミノ酸置換を含む前述の抗体変種のいずれかを作製する方法は、当技術分野において周知である。これらの方法には、部位特異的(またはオリゴヌクレオチドを媒介とした)変異誘発、PCR変異誘発、および抗体または少なくとも抗体の定常領域をコードする調製したDNA分子のカセット変異誘発による調製が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0190】

部位特異的変異誘発は、当技術分野において周知である(例えば、Carter et al. Nucleic Acids Res. 13:4431-4443 (1985)およびKunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1987)を参照されたい)。

【0191】

PCR変異誘発はまた、出発ポリペプチドのアミノ酸配列変種を作製するのに適している。Higuchi, PCR Protocols, 177~183頁(Academic Press, 1990);およびVallette et al., Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989)を参照されたい。

【0192】

配列変種を調製するための別の方法であるカセット変異誘発は、Wells et al., Gene 34:315-323 (1985)によって説明されている技術に基づいている。

30

【0193】

本発明の別の態様は、抗体のFc領域、またはその一部分が、エフェクター誘導活性が天然に低いFc領域(またはその一部分)と交換されている、低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体に関する。例えば、ヒトIgG4定常領域は、低い補体活性化を示すか、または補体活性化を示さない。さらに、異なるIgG分子は、FcRに対する結合親和性が異なり、これはIgGのヒンジ領域の様々な長さおよび柔軟性(IgG3>IgG1>IgG4>IgG2の順に減少する)に、少なくとも一部には起因し得る。例えば、IgG4は、FcRIIaに対して少ない結合を示すか、または結合を示さない。キメラ分子およびキメラ定常領域の例については、例えば、Gillies et al. (Cancer Res. 1999, 59:2159-2166)およびMueller et al. (Mol. Immunol. 1997, 34:441-452)を参照されたい。

40

【0194】

本発明はまた、Fc領域を完全に欠いた、低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体にも関する。このような抗体はまた、本発明の抗体誘導体および抗原結合断片と呼ぶこともできる。このような誘導体および断片は、非抗体タンパク質配列または非タンパク質構造物、特に、動物、例えばヒト対象に投与された場合に送達および/または生物学的利用能を促進するように設計された構造物に融合されてよい(下記を参照されたい)。

【0195】

上述したように、ヒンジ領域内部の変化もまた、エフェクター機能に影響を及ぼす。例えば、ヒンジ領域の欠失により、Fcレセプターに対する親和性が低下する場合があります、か

50

つ補体活性化が低減する場合がある(Klein et al. 1981 PNAS USA 78:524-528)。したがって、本開示はまた、ヒンジ領域中に改変を有する抗体にも関する。

【0196】

特定の態様において、本発明の抗体は、補体依存性細胞障害(CDC)を阻害するように修飾することができる。調整されたCDC活性は、抗体のFc領域中に1つまたは複数のアミノ酸置換、挿入、または欠失を導入することによって実現することができる(例えば、US 6,194,551およびUS 6,242,195を参照されたい)。あるいはまたはさらに、システイン残基をFc領域中に導入し、それによって、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させてもよい。このようにして作製されたホモ二量体抗体は、内在化能力が改善もしくは低下する場合があり、かつ/または補体媒介の細胞死滅が増加もしくは減少する場合がある。Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)ならびにShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)、WO 99/51642、DuncanおよびWinter Nature 322:738-40 (1988);US 5,648,260;US 5,624,821;ならびにWO 94/29351を参照されたい。

10

【0197】

エフェクター機能が抗体の結合親和性によって変わり得ることがさらに理解される。例えば、高親和性の抗体は、比較的low親和性の抗体と比べて補体系を活性化する際により効率的であり得る(Marzocchi-Machado et al. 1999 Immunol Invest 28:89-101)。したがって、抗体は、(例えば、1つまたは複数のアミノ酸残基の置換、付加、または欠失などの方法によって抗体の可変領域を変更することによって)、その抗原に対する結合親和性が低下するように改変することができる。低い結合親和性を有する抗体は、例えば、低いADCCおよび/またはCDCを含む、低いエフェクター機能を示し得る。

20

【0198】

低いエフェクター機能を有する本発明の抗CD154抗体には、親抗CD154抗体または非変種抗CD154抗体と比べて、1つまたは複数のFcレセプター(FcR)に対する結合親和性が低い抗体が含まれる。したがって、低いFcR結合親和性を有する抗CD154抗体には、親抗CD154抗体または非変種抗CD154抗体(例えば、抗体342または抗体5c8)と比べて、1つまたは複数のFcレセプターに対する結合親和性の1.5分の1、2分の1、2.5分の1、3分の1、4分の1、もしくは5分の1、またはそれ以下への低下を示す抗CD154抗体が含まれる。いくつかの態様において、低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体は、親抗体または非変種抗体と比べて約10分の1の低い親和力でFcRに結合する。他の態様において、低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体は、親抗体または非変種抗体と比べて約15分の1の低い親和力または約20分の1の低い親和力でFcRに結合する。FcRレセプターは、Fc RI(CD64)、Fc RII(CD32)、およびFc RIII、ならびにそれらのアイソフォーム、ならびにFc R、Fc μ R、Fc R、および/またはFc Rのうち1つまたは複数でよい。特定の態様において、低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体は、Fc RIIaに対する結合親和性の1.5分の1、2分の1、2.5分の1、3分の1、4分の1、もしくは5分の1、またはそれ以下への低下を示す。

30

【0199】

したがって、特定の態様において、本発明の抗CD154抗体は、第2の抗CD154抗体と比べて補体タンパク質への少ない結合を示す。特定の態様において、本発明の抗CD154抗体は、第2の抗CD154抗体と比べて、約1.5分の1もしくはそれ以下、約2分の1もしくはそれ以下、約3分の1もしくはそれ以下、約4分の1もしくはそれ以下、約5分の1もしくはそれ以下、約6分の1もしくはそれ以下、約7分の1もしくはそれ以下、約8分の1もしくはそれ以下、約9分の1もしくはそれ以下、約10分の1もしくはそれ以下、または約15分の1もしくはそれ以下に減少した結合を示す。

40

【0200】

したがって、特定の態様において、本発明は、対象に投与された場合に低いエフェクター機能を引き出す抗体に関する。特定の態様において、本発明の抗CD154抗体は、抗体が投与される対象において血栓症を引き起こさない。血栓症には、例えば、血栓塞栓性事象が含まれる。このような事象には、例えば、脈管障害(例えば、内膜肥厚のような脈管変化および管壁変化)が含まれる。いくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体は、第2

50

のCD154特異的抗体(例えば、抗体342、抗体5c8、またはヒト化5c8)と比べて少ない血栓塞栓性事象を引き起こす。低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体は、対象に投与し、非変種抗CD154抗体または親抗CD154抗体と比べた場合に、血栓塞栓性事象の数の5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、または50%の減少を示し得る。

【0201】

特定の態様において、本発明の抗CD154抗体は、インビトロで血小板の凝集も活性化も引き起こさず、かつ/または、第2のCD154特異的抗体(例えば、抗体5c8またはヒト化5c8; 実施例1を参照されたい)と比べた場合に、より低い程度で血小板の凝集もしくは活性化を促進する。したがって、特定の態様において、標準的な血小板の凝集または活性化のアッセイ法において本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体が存在する場合、陰性対照のアッセイ法において観察される凝集または活性化より20%、25%、30%、または50%多い凝集も活性化も起こらない。例示的な標準的血小板凝集アッセイ法は、本明細書において説明し(実施例11、アッセイ法1)、図26に示すアッセイ法である。本発明において使用できる標準のアッセイ法および代替の血小板凝集アッセイ法(アッセイ法2、図27)の両方を実施例11で説明する。CD154結合タンパク質は、可溶性でよい。

【0202】

特定の態様において、本発明はまた、CD40Lに特異的かつ一価的に結合する単一の免疫グロブリン可変ドメインを含むCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体であって、CD154への該可溶性タンパク質の結合により、ジャーカットT細胞においてJNKリン酸化が実質的に誘導されないCD154結合タンパク質も提供する。本発明はまた、CD154に特異的かつ一価的に結合する単一の免疫グロブリン可変ドメインを含むCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体であって、CD154への該可溶性タンパク質の結合により、抗CD3抗体で同時刺激されたジャーカットT細胞によるIFN- γ 分泌が実質的に誘導されないCD154結合タンパク質も提供する。

【0203】

本発明の特定の態様は、DR-H1(SEQ ID NO : 3)、CDR-H2(SEQ ID NO : 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 5)より選択される1つまたは複数の重鎖CDR配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。さらなる態様において、抗CD154抗体はこれらのCDRのうち少なくとも2つを含み、および他の態様において、抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO : 3)、CDR-H2(SEQ ID NO : 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 5)である3つの重鎖CDR配列すべてを含む。

【0204】

本発明の他の態様は、CDR-L1(SEQ ID NO : 6)、CDR-L2(SEQ ID NO : 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 8)より選択される1つまたは複数の軽鎖CDR配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。さらなる態様において、抗CD154抗体はこれらの軽鎖CDRのうち少なくとも2つを含み、および他の態様において、抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 6)、CDR-L2(SEQ ID NO : 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 8)である3つの軽鎖CDR配列すべてを含む。

【0205】

本発明のさらなる態様において、低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 6)、CDR-L2(SEQ ID NO : 7)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 8)である3つの軽鎖CDR配列すべてを含み、かつ、CDR-H1(SEQ ID NO : 3)、CDR-H2(SEQ ID NO : 4)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 5)である3つの重鎖CDR配列すべてを含む。

【0206】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する抗CD154抗体であって、SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 10、およびSEQ ID NO : 11より選択されるV_H配列を含む抗CD154抗体を提供する。他の特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する抗体であって、SEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 13より選択される重鎖配列を含む抗体を提供する。さらなる態様において、前述のCDRまたは重鎖配列もしくは軽鎖配列のうち任意の1つまたは複数を含む抗CD154抗体は、Fab断片もしくはFab

10

20

30

40

50

'断片またはその誘導体である。さらに別の態様において、抗体は、 $F(ab')_2$ 断片またはその誘導体である。CD154タンパク質に特異的に結合するCDRまたは重鎖配列もしくは軽鎖配列を含む、他の抗体断片またはそれらの誘導体もまた、含まれる。これらの抗体は、エフェクター機能の低下または消失を誘発するように修飾することができる。したがって、特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 10、およびSEQ ID NO : 11より選択される V_H 配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。

【0207】

他の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 2およびSEQ ID NO : 14より選択される V_L 配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。

10

【0208】

いくつかの態様において、抗体は、SEQ ID NO : 2の可変軽鎖配列を含む。さらなる態様において、SEQ ID NO : 2を含む抗体は、Fab断片もしくはFab'断片またはその誘導体である。さらに他の態様において、抗体は、 $F(ab')_2$ 断片またはその誘導体である。CD154タンパク質に特異的に結合するCDRまたは重鎖配列もしくは軽鎖配列を含む、他の抗体断片またはそれらの誘導体もまた、含まれる。

【0209】

さらなる態様において、本発明は、SEQ ID NO : 2およびSEQ ID NO : 14からなる群より選択される V_L 配列を含み、かつ、SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 9、SEQ ID NO : 10、およびSEQ ID NO : 11より選択される V_H 配列をさらに含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。

20

【0210】

他の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 29の V_H 配列およびSEQ ID NO : 30の V_L 配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。

【0211】

特定の態様において、本発明は、CD154タンパク質に特異的に結合する抗CD154抗体であって、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列を含む抗CD154抗体を提供する。さらなる態様において、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列を含む抗体は、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域(例えば、改変されたグリコシル化および/または他の修飾を有するFc領域)をさらに含む。

30

【0212】

特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列ならびにSEQ ID NO : 12およびSEQ ID NO : 13からなる群より選択される重鎖配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域(例えば、改変されたグリコシル化および/または他の修飾を有するFc領域)をさらに含む抗CD154抗体に関する。

40

【0213】

特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 2またはSEQ ID NO : 14に示される軽鎖配列およびSEQ ID NO : 1、9、10、または11に示される重鎖配列を含む抗CD154抗体を提供する。いくつかの態様において、抗CD154抗体は、抗体断片でよい。さらなる態様において、抗体は、Fab断片もしくはFab'断片またはその誘導体である。さらに別の態様において、抗体は、 $F(ab')_2$ 断片またはその誘導体である。CD154タンパク質に特異的に結合するCDRまたは重鎖配列もしくは軽鎖配列を含む、他の抗体断片またはそれらの誘導体もまた、含まれる。さらに、これらの抗体は、低いエフェクター機能を示してよい。例えば、Fc領域を含む抗体は、抗体が低いエフェクター機能を引き出すか、またはエフェクター機能を引き出さないように、1つまたは複数の修飾(例えば、改変されたグリコシル化、結合など

50

)を有するFc領域を含んでよい。

【0214】

他の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 13の重鎖配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。他の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 15の軽鎖配列およびSEQ ID NO : 12の重鎖配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。

【0215】

いくつかの態様において、本発明は、CDR-H1(SEQ ID NO : 42)、CDR-H2(SEQ ID NO : 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 44)より選択される1つまたは複数の重鎖CDR配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。特定の態様において、抗CD154抗体はこれらの重鎖CDRのうち少なくとも2つを含み、および他の態様において、抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO : 42)、CDR-H2(SEQ ID NO : 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 44)である3つの重鎖CDR配列すべてを含む。

10

【0216】

特定の態様において、本発明は、CDR-L1(SEQ ID NO : 45)、CDR-L2(SEQ ID NO : 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 47)より選択される1つまたは複数の軽鎖CDR配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。特定の態様において、抗CD154抗体はこれらの軽鎖CDRのうち少なくとも2つを含み、および他の態様において、抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 45)、CDR-L2(SEQ ID NO : 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 47)である3つの軽鎖CDR配列すべてを含む。

20

【0217】

本発明のさらなる態様は、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域を含む抗CD154抗体であって、CDR-L1(SEQ ID NO : 45)、CDR-L2(SEQ ID NO : 46)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 47)である3つの軽鎖CDR配列すべてを含み、かつ、CDR-H1(SEQ ID NO : 42)、CDR-H2(SEQ ID NO : 43)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 44)である3つの重鎖CDR配列すべてを含む抗CD154抗体に関する。

30

【0218】

他の態様において、本発明は、CDR-H1(SEQ ID NO : 48)、CDR-H2(SEQ ID NO : 49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 50)より選択される1つまたは複数の重鎖CDR配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。さらなる態様において、抗CD154抗体はこれらの重鎖CDRのうち少なくとも2つを含み、および他の態様において、抗体は、CDR-H1(SEQ ID NO : 48)、CDR-H2(SEQ ID NO : 49)、およびCDR-H3(SEQ ID NO : 50)である3つの重鎖CDR配列すべてを含む。

【0219】

特定の態様において、本発明は、CDR-L1(SEQ ID NO : 51)、CDR-L2(SEQ ID NO : 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 53)より選択される1つまたは複数の軽鎖CDR配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。さらなる態様において、抗体はこれらの軽鎖CDRのうち少なくとも2つを含み、および他の態様において、抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 51)、CDR-L2(SEQ ID NO : 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 53)である3つの軽鎖CDR配列すべてを含む。

40

【0220】

特定の態様において、低いエフェクター機能を有する抗CD154抗体は、CDR-L1(SEQ ID NO : 51)、CDR-L2(SEQ ID NO : 52)、およびCDR-L3(SEQ ID NO : 53)である3つの軽鎖CDR配列すべてを含み、かつ、CDR-H1(SEQ ID NO : 48)、CDR-H2(SEQ ID NO : 49)、およびCDR-H3(S

50

EQ ID NO : 50)である3つの重鎖CDR配列すべてをさらに含む。

【0221】

さらなる態様において、本発明は、CD154に特異的に結合する抗CD154抗体であって、SEQ ID NO : 54のV_L配列を含む抗CD154抗体を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO : 56のV_H配列を含む抗CD154抗体に関する。本発明の抗CD154抗体は、SEQ ID NO : 54のV_L配列およびSEQ ID NO : 56のV_H配列の両方を含んでよい。さらなる態様において、抗体は、Fab断片もしくはFab'断片またはその誘導体である。さらに別の態様において、抗体または抗体断片は、F(ab')₂断片またはその誘導体である。また、抗体または断片は、ヒト化抗体もしくは完全ヒト抗体またはその断片でもよい。本発明の特定の態様は、SEQ ID NO : 56のV_H配列およびSEQ ID NO : 54のV_L配列を含む抗CD154抗体であって、天然Fc領域または親Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える変種Fc領域をさらに含む抗CD154抗体に関する。

10

【0222】

さらなる態様において、本発明は、CD154に特異的に結合する抗CD154抗体であって、SEQ ID NO : 58のV_L配列を含む抗CD154抗体を提供する。さらなる態様において、抗体は、SEQ ID NO : 60のV_H配列を含む。さらなる態様において、抗体または断片は、SEQ ID NO : 60のV_H配列およびSEQ ID NO : 58のV_L配列を含む。抗体は、Fab断片もしくはFab'断片またはその誘導体でよい。さらに別の態様において、抗体は、F(ab')₂断片またはその誘導体である。また、抗体は、ヒト化抗体もしくは完全ヒト抗体またはその断片でもよい。他の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 58のV_H配列およびSEQ ID NO : 60のV_L配列を含む抗CD

20

【0223】

改変されたグリコシル化を有する抗CD154抗体

グリカン除去すると、すべての種に渡るFcレセプターファミリーの全メンバーへの結合を大きく減少させるはずである構造変化が生じる。抗CD154抗体を含むグリコシル化抗体において、Fc二量体のCH2ドメイン中の保存されたN結合部位に結合されたグリカン(オリゴ糖)は、CH2ドメインの間に囲い込まれ、向かい合っているCH2ドメイン上の特定のアミノ酸残基に糖残基が接触する。異なるグリコシル化パターンは、抗体の異なる生物学的特性に関連付けられている(JefferisおよびLund, 1997, Chem. Immunol., 65:111-128; WrightおよびMorrison, 1997, Trends Biotechnol., 15:26-32)。ある種の特定のグリコフォームは、潜在的に有利な生物学的特性を与える。グリカンが失われると、ドメイン間の間隔が変わり、互いに対する可動性が増大し、Fcレセプターファミリーの全メンバーの結合に対して阻害効果を有すると予想される。例えば、様々なグリコシル化抗体を用いたインビトロ研究において、CH2グリカン除去するとFc構造が変化し、その結果、Fcレセプターおよび補体タンパク質C1qへの抗体結合が大きく減少することが実証された。エフェクター機能を低下させるための別の公知のアプローチは、FcのCH2ドメイン中の297位(EU番号付与)のN結合型グリカンの産生を阻害するか、またはそれを除去することである(Nose et al., 1983 PNAS 80:6632; Leatherbarrow et al., 1985 Mol. Immunol. 22:407; Tao et al., 1989 J. Immunol. 143:2595; Lund et al., 1990 Mol. Immunol. 27:1145; Dorai et al., 1991 Hybridoma 10:211; Hand et al., 1992 Cancer Immunol. Immunother. 35:165; Leader et al., 1991 Immunology 72:481; Pound et al., 1993 Mol. Immunol. 30:233; Boyd et al., 1995 Mol. Immunol. 32:1311)。また、異なるグリコフォームが、薬物動態、薬力学、レセプター相互作用、および組織特異的ターゲティングを含む、治療物質の特性に著しく影響を及ぼし得ることも公知である(Graddis et al., 2002, Curr Pharm Biotechnol. 3:285-297)。特に、抗体の場合、オリゴ糖の構造は、抗体のエフェクター機能(例えば、CDCを誘導する補体複合体C1への結合、およびADCC経路の調整に関するFc Rレセプターへの結合)に加えて、プロテアーゼ耐性、FcRnレセプターによって媒介される抗体の血清半減期、食作用、および抗体フィードバックに関連する特性に影響を及ぼし得る(NoseおよびWigzell, 1983; LeatherbarrowおよびDwek, 1983; Leatherbarrow e

30

40

50

t al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, PNAS, 89:4285-4289)。

【0224】

したがって、抗体のエフェクター機能を調整する別の手段は、抗体定常領域のグリコシル化を改変する段階を含む。グリコシル化の改変には、例えば、グリコシル化残基の数の減少または増加、グリコシル化残基のパターンまたは位置の変化、ならびに糖構造の変化が含まれる。ヒトIgG上に存在するオリゴ糖は、エフェクター機能の程度に影響を及ぼす(Raju, T. S. BioProcess International April 2003. 44-53);ヒトIgGオリゴ糖の微小不均一性は、CDCおよびADCCなどの生物学的機能、様々なFcレセプターへの結合、ならびにC1qタンパク質への結合に影響を及ぼし得る(Wright A.およびMorrison SL. TIBTECH 1997, 15 26-32; Shields et al. J Biol Chem. 2001 276(9):6591-604; Shields et al. J Biol Chem. 2002; 277(30):26733-40; Shinkawa et al. J Biol Chem. 2003 278(5):3466-73; Umana et al. Nat Biotechnol. 1999 Feb; 17(2):176-80)。例えば、IgGがC1qに結合し、補体カスケードを活性化する能力は、2つのCH2ドメインの間に位置する炭水化物部分(通常はAsn297で固定されている)の存在、不在、または修飾に依存し得る(WardおよびGhetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995))。

10

【0225】

Fcを含むポリペプチド、例えばIgG抗体のような抗体中のグリコシル化部位は、標準的技術によって特定することができる。グリコシル化部位の特定は、実験によるか、または配列解析もしくはモデリングデータに基づいてよい。コンセンサスモチーフ、すなわち、様々なグリコシルトランスフェラーゼによって認識されるアミノ酸配列が説明されている。例えば、N結合型グリコシル化モチーフのコンセンサスモチーフは、しばしばNXTまたはNXS(Xはプロリン以外の任意のアミノ酸でよい)である。潜在的なグリコシル化モチーフを位置付けるためのいくつかのアルゴリズムもまた、説明されている。したがって、抗体またはFcを含む断片の内部の潜在的なグリコシル化部位を特定するために、例えば、Center for Biological Sequence Analysisによって提供されるウェブサイトのような公的に利用可能なデータベースを用いることによって(N結合型グリコシル化部位を予測するためのNetNGlycサービスおよびO結合型グリコシル化部位を予測するためのNetOGlycサービスを参照されたい)、抗体配列を検査する。

20

【0226】

インビボ研究により、アグリコシル抗体のエフェクター機能の低下が確認された。例えば、アグリコシル抗CD8抗体は、マウスにおいてCD8を有する細胞を枯渇させることができず(Isaacs, 1992 J. Immunol. 148:3062)、アグリコシル抗CD3抗体は、マウスにおいてもヒトにおいても一連のサイトカイン放出現象を誘導しない(Boyd, 1995 前記;Friend, 1999 Transplantation 68:1632)。

30

【0227】

重要なことには、CH2ドメイン中のグリカンの除去は、エフェクター機能に対して重要な影響を有すると思われるが、抗体の他の機能特性および物理的特性は変わらないままである。具体的には、グリカンの除去による血清半減期および抗原への結合に対する影響は皆無もしくはそれに近いことが示された(Nose, 1983 前記;Tao, 1989 前記;Dorai, 1991 前記;Hand, 1992 前記;Hobbs, 1992 Mol. Immunol. 29:949)。

40

【0228】

アグリコシルアプローチのインビボでの検証があるが、アグリコシルmAbに伴う残存するエフェクター機能が報告されている(例えば、Pound, J. D. et al. (1993) Mol. Immunol 30(3):233-41; Dorai, H. et al. (1991) Hybridoma 10(2):211-7を参照されたい)。Armour et al.は、Fc RIIaタンパク質およびFc RIIbタンパク質への残存する結合を示している(Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-1624; Mol. Immunol. 40 (2003) 585-593)。したがって、エフェクター機能、特に補体活性化のさらなる減少は、いくつかの場合において活性の完全な消失を保証するために重要な場合がある。このため、IgG2およびIgG4ならびにG1/G4ハイブリッドのアグリコシル型が、本発明の方法および低いエフェクター機能を有する本発明の抗体組成物において有用であると想定される。

50

【0229】

脱グリコシル化抗CD154抗体またはアグリコシル化抗CD154抗体の作製

本発明の抗CD154抗体を修飾または改変して、Fc部分の他の価値ある特質を任意で保持しつつ(第2のCD154特異的抗体と比べて)低いエフェクター機能を引き出すことができる。

【0230】

したがって、特定の態様において、本発明は、抗体のFc部分のCH2ドメイン中の保存されたN結合部位における修飾を特徴とする、低いエフェクター機能を有するアグリコシル抗CD154抗体に関する。Fc二量体のCH2ドメイン中の保存されたN結合部位の修飾により、アグリコシル抗CD154抗体を得ることができる。このような修飾の例には、Fc二量体のCH2ドメイン中の保存されたN結合部位の変異、CH2ドメイン中のN結合部位に結合されたグリカンの除去、およびグリコシル化の妨害が含まれる。例えば、重鎖CH2ドメイン中の標準的なN結合Asn部位をGln残基に変更することによって、アグリコシル抗CD154抗体を作り出すことができる(例えば、WO 05/03175およびUS 2006-0193856を参照されたい)。

10

【0231】

本発明の1つの態様において、修飾は、その部位でのグリコシル化を妨害するための重鎖グリコシル化部位の変異を含む。したがって、本発明の1つの態様において、アグリコシル抗CD154抗体は、重鎖グリコシル化部位の変異、すなわちN298Q(KabatのEU番号付与によるN297)の変異によって調製され、適切な宿主細胞において発現される。例えば、この変異は、Amersham-Pharmacia Biotech(登録商標)(Piscataway, NJ, USA)社製の独特な部位変異誘発キットの製造業者に推奨されるプロトコールに従うことによって達成することができる。

20

【0232】

変異された抗体は、宿主細胞(例えば、NSO細胞またはCHO細胞)において安定に発現させ、次いで精製することができる。1つの例として、精製は、プロテインAクロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて実施することができる。発現および精製のその他の方法もまた使用され得ることは、当業者には明らかであると考えられる。

【0233】

本発明の別の態様において、アグリコシル抗CD154抗体は低いエフェクター機能を有し、該抗体または抗体誘導体のFc部分のCH2ドメイン中の保存されたN結合部位における修飾は、CH2ドメイングリカンの除去、すなわち脱グリコシル化を含む。これらのアグリコシル抗CD154抗体は、従来の方法によって作製し、次いで酵素的に脱グリコシル化してもよい。抗体を酵素的に脱グリコシル化するための方法は、当業者には周知である(Williams, 1973; WinkelhakeおよびNicolson, 1976 J. Biol Chem. 251:1074-80)。

30

【0234】

本発明の別の態様において、脱グリコシル化は、ツニカマイシンのようなグリコシル化阻害物質を含む培地中で抗体を産生する宿主細胞を増殖させることによって実現することができる(NoseおよびWigzell, 1983)。すなわち、修飾とは、該抗体のFc部分のCH2ドメイン中の保存されたN結合部位におけるグリコシル化の減少または妨害である。

【0235】

本発明の他の態様において、組換えCD154ポリペプチド(またはこのようなポリペプチドを含む細胞もしくは細胞膜)を抗原として用いて、抗CD154抗体または抗体誘導体を生じさせることができ、次いでこれらを脱グリコシル化してよい。

40

【0236】

代替の態様において、本発明のアグリコシル抗CD154抗体またはグリコシル化の少ない抗CD154抗体は、Taylor et al. (WO 05/18572およびUS 2007-0048300)によって説明されている方法を用いて作製することができる。例えば、1つの態様において、抗CD154アグリコシル抗体は、(例えば、置換、挿入、欠失によって、または化学修飾によって)第1のアミノ酸残基を改変することによって作製することができ、この改変された第1のアミノ酸残基は、立体障害もしくは電荷のいずれかまたは両方によって第2の残基のグリコシル化を阻害する。特定の態様において、第1のアミノ酸残基は、アミノ酸置換によって修飾さ

50

れる。さらなる態様において、アミノ酸置換は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Asn、Gln、Trp、Pro、Ser、Thr、Tyr、Cys、Met、Asp、Glu、Lys、Arg、およびHisからなる群より選択される。他の態様において、アミノ酸置換は、非伝統的なアミノ酸残基である。第2のアミノ酸残基は、グリコシル化モチーフ、例えば、アミノ酸配列NXTまたはNXSを含むN結合型グリコシル化モチーフの近くまたは内部にあってよい。1つの例示的な態様において、Kabatの番号付与によれば、第1のアミノ酸残基はアミノ酸299であり、第2のアミノ酸残基はアミノ酸297である。例えば、第1のアミノ酸置換は、Kabatの番号付与によれば、T299A、T299N、T299G、T299Y、T299C、T299H、T299E、T299D、T299K、T299R、T299G、T299I、T299L、T299M、T299F、T299P、T299W、およびT299Vでよい。特定の態様において、アミノ酸置換はT299Cである。

10

【0237】

また、抗体がブロッキング部分を含むように本発明の抗体を修飾することによって、エフェクター機能を低下させることもできる。例示的なブロッキング部分には、例えば、グリコシダーゼがポリペプチドをグリコシル化する能力を妨害することによって、グリコシル化の減少が起こるのに十分な立体容積および/または電荷を有する部分が含まれる。さらにまたはあるいは、ブロッキング部分は、例えば、Fc領域がレセプターまたは補体タンパク質に結合する能力を抑制することによって、エフェクター機能を低下させ得る。いくつかの態様において、本発明は、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 44、およびSEQ ID NO : 50より選択される重鎖CDR3配列ならびに変種Fc領域を含むCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体に関し、この変種Fc領域は第1のアミノ酸残基およびN-グリコシル化部位を含み、この第1のアミノ酸残基は、側鎖化学反応によって修飾されて、未修飾の第1のアミノ酸残基と比べて増大した立体容積または増加した静電荷を実現し、それによって、N-グリコシル化部位でのグリコシル化のレベルを低下させるか、またはそうでなければグリコシル化を改変する。これらの態様のうちいくつかにおいて、変種Fc領域は、対照の非変種Fc領域と比べて低いエフェクター機能を与える。さらなる態様において、立体容積が増大した側鎖は、Phe、Trp、His、Glu、Gln、Arg、Lys、Met、およびTyrからなる群より選択されるアミノ酸残基の側鎖である。さらに別の態様において、静電荷が増加した側鎖成分(chemistry)は、Asp、Glu、Lys、Arg、およびHisからなる群より選択されるアミノ酸残基の側鎖である。

20

【0238】

したがって、1つの態様において、D、E、K、またはRなどの帯電した側鎖成分でT299を置換することによって、グリコシル化およびFc結合を調整することができる。結果として生じる抗体は、望ましくない静電的相互作用が原因で、少ないグリコシル化ならびにFcレセプターへの低いFc結合親和性を有すると考えられる。

30

【0239】

別の態様において、アグリコシル化もされ、かつシステイン付加物を形成することもできるT299C変種抗体は、アグリコシル化された抗体対応物と比べて低いエフェクター機能(例えば、Fc RI結合)を示す場合がある(例えば、WO 05/18572を参照されたい)。したがって、グリコシル化モチーフの近位にある第1のアミノ酸を改変することにより、第2のアミノ酸残基での抗体のグリコシル化を阻害することができ、第1のアミノ酸がシステイン残基である場合、抗体は、さらにもっと低下したエフェクター機能を示し得る。さらに、IgG4サブタイプの抗体のグリコシル化の阻害は、他のサブタイプにおけるアグリコシル化の影響と比べて、Fc RI結合に対してより多大な影響を有する場合がある。

40

【0240】

さらなる態様において、本発明は、1つまたは複数のFcRレセプターに対して少ない結合を示し、かつ任意で1つまたは複数のFcレセプターおよび/または補体に対して、多いかまたは通常の結合も示す、改変されたグリコシル化を有する抗CD154抗体、例えば、1つまたは複数のFcレセプターおよび/または補体に対して天然の対照抗CD154抗体と同じまたは同様の結合親和性を少なくとも維持している、改変されたグリコシル化を有する抗体に関する。例えば、グリカン構造体として主にMan₅GlcNAc₂N-グリカンが存在する抗CD154抗体(

50

例えば、Man₅GlcNAc₂N-グリカン構造体が、Ig組成物の次に主なグリカン構造体よりも少なくとも約5モルパーセント多いレベルで存在する)は、Man₅GlcNAc₂N-グリカン構造体が主ではない抗CD154抗体集団と比べて、変化したエフェクター機能を示し得る。主にこのグリカン構造体を有する抗体は、Fc RIIaおよびFc RIIbに対する結合の減少を示し、Fc RIIaおよびFc RIIbに対する結合の増加を示し、C1複合体のC1qサブユニットに対する結合の増加を示す(US 2006-0257399を参照されたい)。このグリカン構造体は、それが主なグリカン構造体である場合、ADCCを増大させ、CDCを増大させ、血清半減期を延長し、B細胞の抗体産生を増加させ、かつマクロファージによる食作用を減少させる。

【0241】

一般に、糖タンパク質上のグリコシル化構造体は、発現宿主および培養条件によって変化すると考えられる(Raju, TS. BioProcess International April 2003. 44-53)。このような相違が、エフェクター機能および薬物動態の両方に変化をもたらし得る(Israel et al. Immunology. 1996; 89(4):573-578; Newkirk et al. P. Clin. Exp. 1996; 106(2):259-64)。例えば、ガラクトシル化は、細胞培養条件と共に変化する場合があり、それらの特定のガラクトースパターンに応じて、一部の免疫グロブリン組成物を免疫原性にし得る(Patel et al., 1992. Biochem J. 285:839-845)。非ヒト哺乳動物細胞によって産生された糖タンパク質のオリゴ糖構造体は、ヒト糖タンパク質のそれらにより密接に関連している傾向がある。さらに、タンパク質発現用の宿主系は、主なIgグリコフォームを発現するように操作もしくは選択することができるか、あるいは、主なグリカン構造体を有する糖タンパク質を天然に産生することができる。主なグリコフォームを有する糖タンパク質を産生する、操作されたタンパク質発現用の宿主系の例には、遺伝子ノックアウト/変異(Shields et al., 2002, JBC, 277:26733-26740);遺伝子工学(Umana et al., 1999, Nature Biotech., 17:176-180)、または両方の組合せが含まれる。あるいは、ある種の細胞は、主なグリコフォームを天然に発現する - 例えば、ニワトリ、ヒト、および雌ウシ(Raju et al., 2000, Glycobiology, 10:477-486)。したがって、多くの発現宿主系のうち少なくとも1つを選択することによって、当業者は、改変されたグリコシル化(例えば、主に1つの特定のグリカン構造体)を有する抗CD154抗体または抗体組成物の発現を実現することができる。本発明の抗CD154抗体を産生させるために使用され得るタンパク質発現用の宿主系には、動物、植物、昆虫、および細菌細胞などが含まれる。例えば、US 2007-0065909、同2007-0020725、および同2005-0170464では、細菌細胞におけるアグリコシル化免疫グロブリン分子の産生を説明している。さらなる例として、WrightおよびMorrisonは、グリコシル化を欠くCHO細胞株において抗体を産生させ(1994 J Exp Med 180:1087-1096)、この細胞株において産生された抗体は補体媒介の細胞溶解を行う能力がないことを示した。糖タンパク質を産生させるための当技術分野において見出される発現宿主系の他の例には、CHO細胞(Raju WO 99/22764およびPresta WO 03/35835);ハイブリドーマ細胞(Trebak et al., 1999, J. Immunol. Methods, 230:59-70);昆虫細胞(Hsu et al., 1997, JBC, 272:9062-970)、ならびに植物細胞(Gerngross et al., WO 04/74499)が含まれる。所与の細胞または抽出物が所与のモチーフのグリコシル化をもたらす限りにおいて、例えば、ゲル電気泳動および/または質量分析を用いた、モチーフがグリコシル化されたか判定するための当技術分野において認識されている技術が利用可能である。

【0242】

抗体のグリコシル化部位を改変するためのその他の方法は、例えば、US 6,350,861およびUS 5,714,350、WO 05/18572およびWO 05/03175に記載されており、これらの方法を用いて、グリコシル化が変化したか、減少したか、または無い、本発明の抗CD154抗体を産生させることができる。

【0243】

低いエフェクター機能を有するアグリコシル抗CD154抗体は、修飾を含むか、または機能的部分を含むように結合されてよい抗体でよい。このような部分には、ブロッキング部分(例えば、PEG部分、システイン付加物など)、検出可能部分(例えば、診断的部分を含む、蛍光性部分、放射性同位体部分、放射線不透過性部分など)、および/または治療的部分

10

20

30

40

50

(例えば、細胞障害性薬物、抗炎症剤、免疫調節剤、抗感染剤、抗癌剤、抗神経変性剤、放射性核種など)が含まれる。

【0244】

抗体結合体

投与された場合、抗体はしばしば、血液循環から迅速に除去され、したがって、比較的短時間で終わる薬理学的活性を引き出し得る。その結果として、比較的多用量の抗体の頻繁な注射が、抗体処置の治療的有効性を維持するために必要とされる場合がある。

【0245】

本発明の1つの態様において、本発明の抗CD154抗体は、インビボでの抗体の完全性を高め、寿命を延長するように修飾された(例えば、異種機能的部分のような他の部分に結合された)抗体でよい。例えば、本発明の抗CD154抗体は、安定性を高め、それによって抗体の血清半減期を延長することができる部分(機能的部分)を含むように修飾された抗体でよい。本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗体の血清半減期は、少なくとも3日、少なくとも7日、少なくとも14日、少なくとも21日、少なくとも28日、少なくとも1ヶ月またはそれ以上でよい。抗体の半減期を延長するこのような機能的部分は、例えば抗体が抗体断片である態様において特に有用であり得る。

10

【0246】

また、抗体修飾により、水溶液へのタンパク質の溶解度を増し、凝集を無くし、タンパク質の物理的および化学的安定性を高め、かつタンパク質の免疫原性および抗原性を大きく低下させることもできる。結果として、未修飾のタンパク質を用いる場合より少ない頻度または低用量でこのようなポリマー-タンパク質付加物を投与することによって、所望のインビボでの生物活性を実現することができる。

20

【0247】

したがって、特定の態様において、本発明の抗体は、抗体結合体を形成するように異種機能的部分に結合された抗体である。「機能的部分」とは、本発明の抗体と結合している任意の機能的部分(例えば、ポリペプチド、タンパク質ドメイン、担体、ポリマーなど)を意味する。抗CD154抗体との結合は、共有結合または非共有結合によってよく、また、可逆的または調節可能でもよい。本発明のCD154抗体結合体を形成するために使用され得る例示的な分子には、例えば、抗腫瘍薬、薬物、毒素、生物学的に活性なタンパク質、例えば酵素、他の抗体、抗体誘導體、または抗体断片、合成ポリマー(例えばPEG)または天然に存在するポリマー、核酸およびその断片、例えば、DNA、RNAおよびそれらの断片、アプタマー、放射性核種、特に放射性ヨウ化物、放射性同位体、キレート金属、ナノ粒子、ならびにレポーター基、例えば、蛍光性もしくは発光性の化合物またはNMR分光法もしくはESR分光法などの画像処理技術によって検出され得る化合物などの機能的部分が含まれるがそれらに限定されるわけではない。

30

【0248】

さらなる例において、本発明の抗体が結合される機能的部分は、インビボでの抗体の半減期を延長し、かつ/または抗体の免疫原性を低下させ、かつ/または上皮バリアを通過する、免疫系への抗体送達を促進し得る。このタイプの適切な機能的部分の例には、ポリマー、デキストラン、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド(HPMA)、トランスフェリン、アルブミン、アルブミン結合タンパク質、またはPCT/GB2005/002084に記載されているもののようなアルブミン結合化合物が含まれる。

40

【0249】

機能的部分がポリマーである場合、一般に、それは合成ポリマーまたは天然に存在するポリマー、例えば、任意で置換された直鎖もしくは分枝鎖のポリアルキレン、ポリアルケニレン、もしくはポリオキシアルキレンポリマー、または分枝状もしくは非分枝状の多糖類、例えばホモ多糖類もしくはヘテロ多糖類でよい。例えば、VeroneseおよびPasut, 2005, Drug Discovery Today, 10(21):1451-1458; Pasut et al., 2004, Expert Opinion in Therapeutic Patents, 14(6):859-894を参照されたい。

【0250】

50

前述の合成ポリマー上に存在し得る具体的な任意の置換基には、1つまたは複数のヒドロキシ基、メチル基、またはメトキシ基が含まれる。

【0251】

合成ポリマーの具体例には、任意で置換された直鎖または分枝鎖のポリ(エチレングリコール)、ポリ(プロピレングリコール)ポリ(ビニルアルコール)、またはそれらの誘導体、特に、メトキシポリ(エチレングリコール)のような任意で置換されたポリ(エチレングリコール)またはそれらの誘導体が含まれる。

【0252】

具体的な天然に存在するポリマーには、ラクトース、アミロース、デキストラン、グリコーゲン、またはそれらの誘導体が含まれる。この文脈における「誘導体」とは、反応性誘導体、例えば、マレイミドなどのようなチオール選択的反応性基を含むと意図される。反応性基は、直接的またはリンカーセグメントを介して、ポリマーに連結されてよい。このような基の残基が、場合によっては、抗体断片とポリマーの間の連結基として生成物の一部を形成することが理解される。

【0253】

ポリマーのサイズは所望に応じて様々でよいが、一般に、500Da~50000Da、好ましくは5000Da~40000Da、およびより好ましくは20000Da~40000Daの平均分子量範囲である。ポリマーのサイズは、特に、生成物の所期の用途、例えば、腫瘍のような特定の組織に局在する能力または循環血中での半減期を延長する能力に基づいて選択してよい(総説については、Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545を参照されたい)。したがって、例えば、生成物が、例えば腫瘍の処置において使用するために、血液循環を離れ、組織に侵入することが意図される場合、例えば、分子量約5000Daの低分子量ポリマーを使用することが有利である場合がある。生成物が血液循環中に残る用途の場合、例えば、20000Da~40000Daの範囲の分子量を有する、より高分子量のポリマーを使用することが有利である場合がある。

【0254】

特に好ましいポリマーには、特に約15000Da~約40000Daの範囲の分子量を有する、ポリアルキレンポリマー、例えば、ポリ(エチレングリコール)もしくは特にメトキシポリ(エチレングリコール)またはその誘導体などが含まれる。

【0255】

好ましくは、低いエフェクター機能を有する抗体または断片を含む、本発明の抗体、抗体誘導体、または抗体断片は、ポリアルキレンポリマー、特にポリ(エチレングリコール)(本明細書においてPEGと略す)、またはその誘導体に結合される。特定の態様において、本発明の抗体、抗体誘導体、または抗体断片は、重鎖もしくは軽鎖のいずれかまたは両方がPEGに付着しているFab'断片もしくはF(ab')₂断片またはその誘導体である抗体断片である。このFab'断片またはそのF(ab')₂断片は、ヒト由来またはヒト化されていてよい。

【0256】

したがって、本発明の特定の態様において、本発明の抗CD154抗体は、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレングリコール)およびポリ(プロピレングリコール)の共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、またはポリ(プロリン)などの水溶性ポリマーのような機能的部分の共有結合によって修飾されている抗体である。これらはすべて、対応する未修飾タンパク質よりも、静脈注射後に血液中中で実質的に長い半減期を示すことが公知である。例えば、Abuchowski et al. 1981. 「Enzymes as Drugs」、Holcenberg et al. (編) 1981. Wiley-Interscience, New York, NY, 367-383 (1981); Anderson, W.F. 1992. *Human Gene Therapy*. Science 256:808-813; Newmark et al. 1982. *J. Appl. Biochem.* 4:185-189; Katre et al. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1487-1491を参照されたい。

【0257】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、ポリ(エチレングリコール)(PEG)部分のような機能的部分に結合された抗体である。1つの具体的な態様において、抗体は抗体断片

10

20

30

40

50

であり、PEG分子は、抗体断片中に位置する利用可能な任意のアミノ酸側鎖または末端アミノ酸の官能基、例えば、任意の遊離のアミノ基、イミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、またはカルボキシル基を介して結合されてよい。このようなアミノ酸は、抗体断片中に天然に存在してよいが、または組換えDNA法を用いて断片中に人工的に作り出してよい(例えば、US 5,219,996;US 5,667,425;WO 98/25971を参照されたい)。別の態様において、本発明のFab断片は、機能的部分の結合を可能にする1つまたは複数のアミノ酸をその重鎖のC末端に付加することによって修飾される。好ましくは、付加的なアミノ酸は、機能的部分が結合され得る1つまたは複数のシステイン残基を含む修飾されたヒンジ領域を形成する。複数の部位が、2つまたはそれ以上のPEG分子を結合させるために使用され得る。

【0258】

本発明の特定の局面において、PEG分子は、本発明の抗体断片中に位置する少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を介して共有結合される。修飾された抗体断片に結合される各PEG分子は、断片中に位置するシステイン残基の硫黄原子に共有結合され得る。共有結合は、一般に、ジスルフィド結合、または特に硫黄-炭素結合である。チオール基が結合箇所として使用される場合、適切に活性化された機能的部分、例えば、マレイミドおよびシステイン誘導体などのチオール選択的誘導体を使用され得る。前述のPEG修飾された抗体断片を調製する際、活性化PEGを出発原料として使用してよい。活性化PEGは、 α -ハロカルボン酸またはエステル、例えば、ヨードアセトアミド、イミド、例えば、マレイミド、ビニルスルホン、またはジスルフィドなどのチオール反応性基を含む任意のPEGでよい。特定の態様において、抗CD154抗体結合体は、2つのマレイミド分子を有する2つのPEG分子を含んでよい。出発原料は、(例えば、Nektar(以前はShearwater Polymers Inc.)Huntsville, AL, USAから)市販されているものを得てもよく、または従来の化学的手順を用いて、市販されている出発原料から調製してもよい。具体的なPEG分子には、20Kメトキシ-PEG-アミン(Nektar(以前はShearwater)、Rapp Polymere、およびSunBioから入手可能)ならびにM-PEG-SPA(Nektar(以前はShearwater)から入手可能)が含まれる。

【0259】

1つの好ましい態様において、本発明の抗体は、例えば、EP 0948544で開示されている方法に従ってペグ化されている、すなわち、PEG(ポリ(エチレングリコール))がそれに共有結合している、修飾されたFab断片である(同様に、「Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications」1992, J. Milton Harris (編), Plenum Press, New York、「Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications」1997, J. Milton HarrisおよびS. Zalipsky(編), American Chemical Society, Washington DC、ならびに「Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences」1998, M. AslamおよびA. Dent, Grove Publishers, New York;Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545も参照されたい)。1つの例において、PEGは、ヒンジ領域中のシステインに結合される。別の例において、PEG修飾されたFab断片は、修飾されたヒンジ領域中の単一のチオール基に共有結合されたマレイミド基を有する。リジン残基は、マレイミド基に共有結合されてよく、リジン残基上の各アミン基には、約20,000Daの分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)ポリマーが結合されてよい。したがって、Fab断片に結合されたPEGの合計分子量は、約40,000Daであってよい。

【0260】

別の態様において、機能的部分はPEGであり、WO 98/25971およびWO 04/72116に記載されている方法を用いて結合される。この方法では、リジル-マレイミド基が、重鎖のC末端のシステイン残基に結合され、リジル残基の各アミノ基が、約20,000Daの分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)残基をそれに共有結合させている。したがって、抗体に結合されたPEGの合計分子量は、約40,000Daである。

【0261】

別の態様において、機能的部分はPEGであり、WO 98/25971およびWO 04/72116に記載されている方法を用いてF(ab)₂断片に結合される。この方法では、リジル-ジマレイミド基

10

20

30

40

50

が、各Fab重鎖のC末端のシステイン残基に結合され、リジル残基の各アミノ基が、約20,000Daの分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)残基をそれに共有結合させている。したがって、F(ab)₂抗体に結合されたPEGの合計分子量は、約40,000Daである。

【0262】

本発明の特定の態様において、本発明の抗体は、Fab'抗体断片であり、完全にヒト由来であるか、またはヒト化されていてよく、重鎖、軽鎖、または両方のいずれかがペグ化されている。他の態様において、抗体断片は、完全にヒト由来であるか、またはヒト化されていてよく、一方もしくは両方の重鎖、もしくは一方もしくは両方の軽鎖、または両方の重鎖および軽鎖がペグ化されている。

【0263】

したがって、特定の態様において、抗CD154抗体は、PEGが抗体のシステイン残基またはリジン残基に連結されている、PEG結合抗体(例えば、PEG結合ヒト抗体)である。特定の態様において、ペグ化された抗CD154抗体は、少なくとも24kDの流体力学的サイズを有する。他の態様において、PEGは、20~60kD(両端の数値を含む)の任意のいろいろなサイズでよい。さらなる態様において、PEG結合抗CD154抗体は、少なくとも200kDの流体力学的サイズを有する。抗CD154抗体がPEG部分に連結される本発明の態様において、ペグ化抗CD154抗体は、PEG部分を欠く抗CD154抗体と比べて長いインビボでの半減期を有し得る。

【0264】

特定の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 15の軽鎖配列およびSEQ ID NO: 13の重鎖配列を含み、ペグ化されているCD154結合タンパク質を提供する。

【0265】

本発明の抗体のインビボでの完全性および寿命を改善する際に有用であり得る他の機能的部分にはポリペプチドが含まれる。例えば、本発明の抗CD154抗体または抗体断片は、ヒト血清アルブミン(HSA)ポリペプチドを含むように修飾することができる。このような抗体結合体は、結合されていない抗体または抗原結合断片と比べて、高い安定性および長い血清半減期を示し得る。例えば、特定の態様において、HSAに結合された抗CD154抗体は、結合されていない抗CD154抗体と比べて、長いインビボ半減期を示し得る。HSA結合抗体の半減期(t_{1/2}半減期またはt_{1/2}半減期)は、10%、20%、30%、40%、50%、またはそれ以上延長され得る。t_{1/2}半減期は、例えば0.25分~12時間の範囲内であり得るのに対し、t_{1/2}半減期は、例えば12~48時間の範囲内であり得る。t_{1/2}半減期またはt_{1/2}半減期は、好ましくは、少なくとも3日、少なくとも7日、少なくとも14日、少なくとも21日、少なくとも28日、少なくとも1ヶ月、またはそれ以上でよい。

【0266】

本発明のいくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体は、検出可能マーカー、例えば、放射性同位体、酵素、色素もしくはビオチン、または他の親和性反応物で標識することによって、機能的部分で修飾された抗体である。

【0267】

本発明のいくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体は、治療物質、例えば、放射性同位体もしくは放射性核種(例えば、¹¹¹Inもしくは⁹⁰Y)、毒素部分(例えば、破傷風トキソイドもしくはリシン)、トキソイド、または化学療法剤(US 6,307,026)に結合されることによって機能的部分で修飾された抗体である。

【0268】

本発明のいくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体は、造影剤に結合されることによって修飾された抗体である。造影剤は、例えば、単離または検出を容易にするための標識部分(例えば、ビオチン、蛍光性部分、放射性部分、ヒスチジンタグもしくはmycタグ、または他のペプチドタグ)を含んでよい。

【0269】

本発明の抗CD514抗体を修飾するため、または本発明の抗CD514抗体に結合させるための機能的部分のその他の例には、血清毒素、または細胞に対して有害である(例えば、死滅させる)任意の作用物質を含む細胞障害性薬物が含まれ得る。例には、コンプレスタチン(

10

20

30

40

50

combrestatin)、ドラスタチン、エポチロン、スタウロスポリン(staurosporin)、マイタンシノイド、スポンギスタチン、リゾキシム、ハリコンドリン、ロリジン、ヘミアステルリン、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または同族体が含まれる。

【0270】

結合にあたって有用な機能的部分には、葉酸代謝拮抗薬(例えば、アミノプテリンおよびメトトレキサート)、代謝拮抗薬(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)(シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルピシン(以前はダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、(ダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン(AMC)、カリケアミシンまたはデュオカルマイシン、CC-1065、エンジエイエン(enedielyene)、ネオカルチノスタチン)、ならびに有糸分裂阻害薬(例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。さらなる詳細については、Garnett, 2001, Advanced drug Delivery Reviews 53:171-216を参照されたい。

【0271】

他の機能的部分には、 ^{131}I 、 ^{111}In 、および ^{90}Y 、 Lu^{177} 、ビスマス 213 、カリホルニウム 252 、イリジウム 192 、ならびにタンゲステン 188 /レニウム 188 、 ^{211}As スタチンなどのキレート化放射性核種;または非限定的に、アルキルホスホコリン、トポイソメラーゼI阻害剤、タキソイド、およびスラミンなどの薬物が含まれ得る。

【0272】

その他の機能的部分には、タンパク質、ペプチド、および酵素が含まれる。関心対象の酵素には、タンパク分解酵素、加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼが含まれるが、それらに限定されるわけではない。関心対象のタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドには、免疫グロブリン、毒素(アプリン、リシンA、シュードモナス(pseudomonas)外毒素、もしくはジフテリア毒素など)、マイタンシノイド(例えば、非限定的にDM1)、タンパク質(インスリン、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、もしくは組織プラスミノゲン活性化因子など)、血栓性物質(thrombotic agent)もしくは抗血管新生薬、例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン、アンジオゲニン、ゲロニン、ドルスタチン(dolstatin)、副溝結合剤、ビス-ヨード-フェノールマスタード、または、リンフォカイン、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、神経成長因子(NGF)、もしくは他の増殖因子などの生体応答調節物質が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0273】

他の機能的部分は、例えば、診断にあたって有用な検出可能物質を含んでよい。検出可能物質の例には、様々な酵素、補欠分子団、蛍光性材料、発光材料、生物発光材料、放射性核種、陽電子放出金属(陽電子放出断層撮影法で使用するため)、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。診断用物質として使用するために抗体に結合させることができる金属イオンに関しては、一般にUS 4,741,900を参照されたい。適切な酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ;適切な補欠分子団にはストレプトアビジン、アビジン、お

10

20

30

40

50

よびビオチンが含まれ;適切な蛍光性材料には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、およびフィコエリトリンが含まれ;適切な発光材料にはルミノールが含まれ;適切な生物発光材料にはルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ;適切な放射性核種には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、および ^{99}Tc が含まれる。

【0274】

核酸

特定の局面において、本発明は、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体をコードする核酸に関する。

【0275】

したがって、特定の態様において、本発明は、
SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:

17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID
NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ
ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33,
SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO:
59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 70 および SEQ ID NO: 73

からなる群より選択される1つまたは複数の配列を含む単離されたDNA分子、組換えDNA分子、および/または合成DNA分子に関する。

【0276】

別の局面において、本開示は、
SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2; SEQ
ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 29,
SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58 もしくは
SEQ ID NO: 60

の可変ドメイン配列の配列に少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一である配列を含むポリペプチドをコードする1つもしくは複数の配列、または
SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9,

SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: SEQ ID NO: 56

もしくは SEQ ID NO: 60

の可変ドメイン配列の配列をコードする核酸に(例えば、ストリンジェントな条件下で)ハイブリダイズする配列を含む、単離された核酸を特徴とする。

【0277】

本発明の核酸は、調節配列(例えば、プロモーター配列、非翻訳5'領域、および非翻訳3'領域)ならびに/またはベクター配列をさらに含んでよい。例えば、核酸はベクターを構成する。さらに別の態様において、本発明は、ベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、(例えば、Fc領域が存在する場合に)少ないグリコシル化を示すか、またはグリコシル化を示さないような抗体を産生し得る。

【0278】

本発明はまた、前述の核酸の配列変種にも関する。例えば、本発明は、その断片およびその相補物を含む、本明細書において提供される配列のいずれかに約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、99.5%、99.9%、または100%同一である核酸配列を含む。本発明はまた、遺伝コー

10

20

30

40

50

ドの縮重が原因で本明細書において具体的に提供される配列とは異なる核酸も含む。

【0279】

さらに、本発明は、本明細書において提供される核酸のいずれかに特異的にハイブリダイズする配列も含む。「特異的にハイブリダイズする」という用語は、ある核酸配列が、本明細書において提供される配列またはそれに相補的な配列の少なくとも12個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、または100個の連続したヌクレオチドに、対照核酸(例えば、非特異的DNAまたは本明細書において提供される特定の抗体配列以外のDNA)へのバックグラウンドのハイブリダイゼーションが15%未満、好ましくは10%未満、およびより好ましくは5%未満となるようにハイブリダイズする能力を指す。様々なハイブリダイゼーション条件を用いて特異的なハイブリダイゼーションを検出することができ、ストリンジェンシーは、主としてハイブリダイゼーションアッセイ法の洗浄段階によって決定される。一般に、高温および低い塩濃度は高いストリンジェンシーを与え、低温および高い塩濃度は低いストリンジェンシーを与える。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、例えば、約2.0×SSC中、50°での洗浄によって実現され、高ストリンジェンシーは、約0.2×SSC、50°で実現される。

10

【0280】

本発明のCD154結合タンパク質をコードする核酸は、リーダー配列またはシグナル配列を含んでよい。リーダー配列およびシグナル配列は様々でよく、代替のリーダー配列で置換されてよく、かつ、特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質は、リーダー配列を含まない配列を含むことが理解される。任意の適切な代替のリーダー配列またはシグナル配列が使用され得る。

20

【0281】

宿主細胞

本発明は、その配列変種を含む、図2~8、10、11、および13~16において提供されるDNA分子のいずれかを発現するように操作された宿主細胞に関する。

【0282】

本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を発現する宿主細胞もまた、提供される。結合タンパク質であろうと抗体であろうと、それは、ただ1つの鎖を含むことができ、その場合、そのポリペプチド鎖をコードするDNA配列のみが、細胞をトランスフェクトするために使用される必要がある。2つの鎖を含む抗体を作製する場合、細胞株は2つのベクターでトランスフェクトされ得る。あるいは、適切な場合には、単一のベクターが両方の鎖の配列、例えば、抗CD154抗体の軽鎖および重鎖、ならびに発現されるべき特定の抗体構造に応じた変化をコードしてもよい。宿主細胞は、例えば、大腸菌のような原核細胞、もしくは他の微生物細胞、または、ヒト細胞、マウス細胞、サル細胞、ウサギ細胞、ヤギ細胞、ハムスター細胞、もしくはラット細胞などの哺乳動物細胞、昆虫細胞、トリ細胞、植物細胞、および真菌細胞のような下等真核細胞を非限定的に含む真核細胞でよい(下記を参照されたい)。宿主細胞の機構が、組換えによって発現されたタンパク質のグリコシル化に関与しており、したがって、本発明の抗体のエフェクター機能をさらに改変するために、特定のグリコシル化パターンを選択できることが理解される。

30

【0283】

本発明のいくつかの態様において、本発明を実践するために有用な宿主細胞は、例えば、(1)細菌細胞、例えば、大腸菌、カウロバクター・クレセントス(*Caulobacter crescentus*)、連鎖球菌(*Streptococci*)、ブドウ球菌(*Staphylococci*)、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)種、および枯草菌(*Bacillus subtilis*)細胞、ならびにネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*);(2)真菌細胞およびアスペルギルス属(*Aspergillus*)細胞、酵母細胞、例えば、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、ピキア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)、他のピキア属種、*K.ラクティス*(*Lactis*)、(3)昆虫細胞株、例えば、スポドプテラ・フルギペルタ(*Spodoptera frugiperda*)に由来するもの(例えば、Sf9細胞株およびSf21細胞株、ならびにexpresSF(商標)細胞(Protein Sciences Cor

40

50

p., Meriden, CT, USA)), ショウジョウバエ(*Drosophila*)S2細胞、およびイラクサギンウワバ(*Trichoplusia ni*) High Five(登録商標)細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA);(4)哺乳動物細胞、または(5)植物細胞でよい。

【0284】

したがって、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体は、外因性核酸配列を発現するように操作され得る任意の利用可能な原核宿主細胞または真核宿主細胞において産生させることができる。本発明の抗CD154抗体を産生させるために使用され得る下等真核宿主細胞には、当技術分野において説明されている細胞が含まれる(例えば、WO 02/00879、WO 03/056914、WO 04/074498、WO 04/074499、Choi et al., 2003, PNAS, 100:5022-5027; Hamilton et al., 2003, Nature, 301:1244-1246、およびBobrowicz et al., 2004, Glycobiology, 14:757-766を参照されたい)。

10

【0285】

典型的な哺乳動物細胞には、COS1細胞およびCOS7細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NS0骨髄腫細胞、NIH3T3細胞、293細胞、HEPG2細胞、HeLa細胞、C127、3T3、BHK、ボーズ(Bowes)黒色腫細胞、L細胞、MDCK、HEK293、WI38、マウスES細胞株(例えば、129/SV、C57/BL6、DBA-1、129/SVJ系統に由来する)、K562、ジャーカット細胞、ならびにBW5147が含まれる。したがって、本発明は、本発明の抗体を発現するように組換えによって改変された、ハイブリドーマ細胞、B細胞、プラズマ細胞、ならびに哺乳動物宿主細胞およびヒト宿主細胞(例えば、成体胚性幹細胞)を非限定的に含む、本発明の抗体を発現する細胞を提供する。他の有用な哺乳動物細胞株は周知であり、かつ、American Type Culture Collection(米国微生物株保存機関)(「ATCC」)(Manassas, VA, USA)およびCoriell Cell Repositories(Camden, NJ, USA)のNational Institute of General Medical Sciences(米国立総合医学研究所)(NIGMS) Human Genetic Cell Repositoryから容易に入手可能である。これらの細胞型は代表にすぎず、このリストは網羅的なリストであることを意図しない。

20

【0286】

一部を前述した他の考慮すべき事柄のうちで、宿主細胞は、発現された抗CD154抗体を所望の様式で処理する能力を理由として選択してよい。改変されたグリコシル化およびアグリコシル化のほかに、ポリペプチドのこのような翻訳後修飾には、アセチル化、カルボキシル化、カルボキシメチル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化が含まれるがそれらに限定されるわけではない。

30

【0287】

本発明の別の態様において、本発明の抗CD154抗体は、無細胞翻訳によって調製されるか、またはインビトロで合成される。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、インビトロで合成することができる。

【0288】

別の態様において、本発明の抗CD154抗体は、大規模な製造を容易にするために、抗体発現細胞を含むバイオリアクターにおいて製造される。

【0289】

別の態様において、本発明のCD154結合タンパク質または抗CD154抗体は、抗CD154抗体の大規模な製造を容易にするために、乳汁中に抗体を発現する遺伝的に操作された哺乳動物またはトランスジェニック哺乳動物(例えば、ヤギ、雌ウシ、ヒツジ)において産生される(US 5,827,690; Pollock et al. 1999. J. Immunol. Meth. 231(1-2):147-57)。

40

【0290】

治療方法

本発明の1つの態様において、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、対象において免疫応答を抑制することができる。本発明の抗体または本発明の薬学的組成物は、有効な阻害量で対象に投与される。

【0291】

特定の態様において、抗CD154抗体または抗体を含む薬学的組成物の「有効な阻害量」

50

とは、それが投与される対象においてCD154-CD40相互作用を阻害するのに有効である任意の量である。「阻害量」を決定する方法は当業者に周知であり、関与する対象のタイプ、対象の大きさおよび年齢、ならびに送達される個々の治療物質の薬物動態学的特性を非限定的に含む因子に依存する。

【0292】

本発明の別の特定の態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、CD154-CD40相互作用を阻害することによって免疫応答を抑制することができる。

【0293】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、炎症を抑制することができる。本発明の目的において、炎症応答は、浮腫および貪食白血球の遊走を伴う毛細血管拡張の結果として、発赤、腫脹、熱、および疼痛を特徴とする。炎症応答のいくつかの例には、関節炎、接触性皮膚炎、高IgE症候群、炎症性腸疾患、アレルギー性喘息、および特発性炎症性疾患が含まれる。特発性炎症性疾患には、例えば、乾癬および狼瘡(例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、薬剤性エリテマトーデス、およびループス腎炎(lupus nephritis)が含まれる。例えば、Gallin 1989. Fundamental Immunology, 26章、Raven Press、第2版、721~733頁、New Yorkを参照されたい。本発明は、個体において全身性エリテマトーデス(SLE)の症状を処置または予防する方法であって、SLEの症状を処置または予防するのに有効な量で、一価のCD154結合タンパク質、例えば、一価の抗CD154抗体を個体に投与する段階を含む方法を提供する。

10

20

【0294】

関節炎のいくつかの例には、関節リウマチ、非リウマチ性炎症性関節炎、ライム病に関連した関節炎、および炎症性変形性関節症が含まれる。特発性炎症性疾患のいくつかの例には、乾癬および全身性ループスが含まれる。

【0295】

本発明の1つの態様において、抗CD154抗体または抗体を含む薬学的組成物は、対象による移植された器官の拒絶を抑制することができる。

【0296】

本発明のより具体的な態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、対象による移植された心臓、腎臓、肝臓、皮膚、膵島細胞、または骨髄の拒絶を抑制することができる。

30

【0297】

本発明の1つの態様において、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、対象において移植片対宿主疾患を抑制することができる。

【0298】

本発明の1つの態様において、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、対象において、アレルギー応答、例えば、枯草熱またはペニシリンもしくは他の薬物に対するアレルギーを抑制することができる。

【0299】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、自己免疫疾患に罹患している対象において自己免疫応答を抑制することができる。いくつかの態様において、自己免疫応答は、以下からなる群より選択される容態に関連しているか、または由来する：関節リウマチ、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、真性糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、多発性硬化症、乾癬、薬剤性自己免疫疾患、または薬剤性ループス。特定の態様において、自己免疫応答は、全身性エリテマトーデスに関連しているか、または由来する。

40

【0300】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、ま

50

たは抗体を含む薬学的組成物は、感染症に由来する自己免疫応答に苦しんでいる対象において自己免疫応答を抑制することができる。

【0301】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、ライター症候群、脊椎関節炎、ライム病、HIV感染症、梅毒、または結核に由来する自己免疫応答に苦しんでいる対象において自己免疫応答を抑制することができる。

【0302】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、対象において線維症を抑制することができる。

10

【0303】

線維症のいくつかの例には、肺線維症または線維性疾患(fibrotic disease)が含まれる。肺線維症のいくつかの例には、成人呼吸窮迫症候群に続発する肺線維症、薬剤性肺線維症、特発性肺線維症、または過敏性肺炎が含まれる。線維性疾患のいくつかの例には、C型肝炎;B型肝炎;硬変;毒性障害に続発する肝硬変;薬物使用に続発する肝硬変;ウイルス感染症に続発する肝硬変;および自己免疫疾患に続発する肝硬変が含まれる。

【0304】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、胃腸疾患を抑制することができる。胃腸疾患のいくつかの例には、食道運動障害、炎症性腸疾患(クローン病および潰瘍性大腸炎を含む)、胃炎、コラーゲン形成大腸炎(リンパ球性大腸炎および顕微鏡的大腸炎を含む)、セリアック病(グルテン腸症、セリアックスブルー、またはグルテン不耐症とも呼ばれる)、ならびに強皮症が含まれる。

20

【0305】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、血管疾患を抑制することができる。血管疾患のいくつかの例には、アテローム性動脈硬化症、腎動脈疾患、リンパ水腫、虚血性障害、および再灌流障害が含まれる。また、全身性エリテマトーデスまたはクリオグロブリン血症などの膠原血管病/免疫複合体病も含まれる。

【0306】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、T細胞癌、例えばT細胞白血病またはT細胞リンパ腫に罹患している対象においてT細胞腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。このような抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、その対象においてT細胞腫瘍細胞の増殖を抑制するのに有効な量で対象に投与することができる。

30

【0307】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、ヒトT細胞リンパ球向性ウイルス1型(HTLV 1)による対象のT細胞のウイルス感染を阻害することができる。このような抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、ウイルス感染を阻害するのに有効な量で対象に投与することができる。

40

【0308】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、本発明の抗体が特異的に結合するCD154タンパク質を発現する、対象中の腫瘍細胞または新生細胞を画像化することができる。対象中の腫瘍細胞または新生細胞を画像化するための方法は、抗体と腫瘍細胞または新生細胞の表面のタンパク質との複合体の形成を可能にする条件下で本発明の抗CD154抗体またはそれを含む組成物の有効量を対象に投与する段階、および形成された任意の抗体/タンパク質複合体を画像化し、それによって対象中の任意の腫瘍細胞または新生細胞を画像化する段階を含む。

50

【0309】

本発明の1つの態様において、本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体、または抗体を含む薬学的組成物は、本発明の抗体が特異的に結合するCD154タンパク質を発現する、対象中の腫瘍細胞または新生細胞の存在を検出することができる。対象中の腫瘍細胞または新生細胞の存在を検出するための1つのこのような方法は、抗体とタンパク質との複合体の形成を可能にする条件下で本発明の抗CD154抗体またはそれを含まる薬学的組成物の有効量を対象に投与する段階、対象から任意の未結合の造影剤を除去する段階、および形成された任意の抗体/タンパク質複合体の存在、すなわち、対象中の腫瘍細胞または新生細胞の存在を示唆するこのような複合体の存在を検出する段階を含む。

【0310】

薬学的組成物

本発明は、本発明において説明するように、CD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【0311】

本発明の1つの態様において、薬学的組成物は、少なくとも1つの本発明のCD154結合タンパク質、例えば抗CD154抗体を含む。

【0312】

本発明の1つの態様において、本発明のアグリコシル抗CD154抗体(もしくは低いエフェクター機能を有する他の抗CD154抗体)またはその抗体を含む薬学的組成物は、CD154抗原(例えば、ATCCアクセッション番号PTA-4931の細胞株によって産生されるアグリコシルhu5c8が特異的に結合するCD154抗原)に結合することができ、このアグリコシル抗CD154抗体は、N298Qの変異(EU Kabat番号付与を用いるとN297)を有することを特徴とし、本明細書の別の箇所で説明するような低いエフェクター機能をさらに示す。

【0313】

本発明の特定の態様において、アグリコシル抗CD154抗体(もしくは低いエフェクター機能を有する他の抗CD154抗体)またはその抗体を含む薬学的組成物は、エフェクターレセプターに結合しない。より具体的な態様において、アグリコシル抗CD154抗体またはその抗体を含む薬学的組成物は、ATCCアクセッション番号PTA-4931の細胞株によって産生されるアグリコシルhu5c8が特異的に結合するCD154タンパク質に結合することができ、このアグリコシル抗CD154抗体または薬学的組成物は、エフェクターレセプターに結合しない。

【0314】

本発明の特定の態様において、アグリコシル抗CD154抗体(または低いエフェクター機能を有する他の抗CD154抗体もしくはCD154結合タンパク質)またはその抗体を含む薬学的組成物は、血栓塞栓性事象を含む血栓症を引き起こさない。本発明のより具体的な態様において、アグリコシル抗CD154抗体またはその抗体を含む薬学的組成物は、ATCCアクセッション番号PTA-4931の細胞株によって産生されるアグリコシルhu5c8が特異的に結合するCD154タンパク質に結合することができ、このアグリコシル抗CD154抗体または薬学的組成物は、血栓症を引き起こさない。

【0315】

本発明の別の態様において、薬学的組成物は、任意の1つまたは複数の薬学的に許容される担体、補助剤、送達ビヒクル、緩衝剤、および/または安定化剤をさらに含んでよい。本発明の抗体の製剤化および投与のための例示的な技術は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co., Easton, PA)の最新版において確認することができる。

【0316】

本発明のより具体的な態様において、薬学的に許容される担体は、リン酸緩衝化生理食塩水、生理食塩水、水、クエン酸/スクロース/Tween配合物、およびエマルジョン、例えば水中油型エマルジョンである。

【0317】

本発明の1つの態様において、薬学的組成物は、組成物に対する宿主の免疫応答を低減

10

20

30

40

50

させるか、または防止するために、マイクロカプセル化器具に入れて送達してよい。本発明の抗体または抗体断片などの結合物質もまた、例えば、リポソームまたは他のカプセル化送達ビヒクルもしくは免疫保護された送達ビヒクルなどの膜にマイクロカプセル化して送達してよい。

【0318】

本発明の1つの態様において、薬学的組成物は、無菌注射用製剤、例えば、無菌注射用水性懸濁剤または無菌注射用油性懸濁剤の形態であってもよい。この懸濁剤は、適切な分散剤、湿潤剤、および懸濁化剤を用いて、当技術分野において公知の技術に従って調剤することができる。

【0319】

本発明の1つの態様において、薬学的組成物は、経口的に、局所的に、または静脈内に送達してよい。全身的に投与される場合、治療用組成物は、無菌で、実質的にパイロジェンフリーで、かつ、pH、等張性、および安定性を十分に考慮した非経口的に許容される溶液中にあるべきである。例えば、薬学的製剤は、ヒト治療薬としての投与に適するように、発熱性材料を実質的に含まない。これらの条件は当業者に公知である。

【0320】

本発明のより具体的な態様において、経口投与の場合、薬学的組成物は、適切なカプセル剤、錠剤、水性の懸濁剤または液剤中に調剤される。経口投与用の組成物の固形製剤は、トウモロコシデンプン、ゼラチン、ラクトース、アラビアゴム、スクロース、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸ニカルシウム、炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、またはアルギン酸など適切な担体または賦形剤を含んでよい。使用され得る崩壊剤には、微結晶性セルロース、トウモロコシデンプン、グリコール酸デンプンナトリウム、およびアルギン酸が含まれるがそれらに限定されるわけではない。使用され得る錠剤結合剤には、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン(Povidone(商標))、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロース、デンプン、およびエチルセルロースが含まれる。使用され得る滑沢剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、シリコーン流体、タルク、ロウ、油、およびコロイドシリカが含まれる。

【0321】

本発明のより具体的な態様において、局所適用の場合、薬学的組成物は適切な軟膏剤中に調剤されてよい。局所使用向けの組成物の製剤のいくつかの例には、活性成分ならびに様々な担持体(support)およびビヒクルを含む、点滴剤、チンキ剤、ローション剤、クリーム剤、液剤、および軟膏剤が含まれる。

【0322】

本発明の1つの態様において、局所用半固体軟膏製剤は、典型的には、薬学的クリーム基剤のような担体中に約1~20%、例えば5~10%の濃度の活性成分を含む。

【0323】

本発明の1つの態様において、吸入用の薬学的組成物および経皮組成物もまた、容易に調製することができる。治療用組成物は、例えば、液状または粉末状のエアロゾル(凍結乾燥された)として、鼻または肺を通じて投与することができる。

【0324】

本発明の1つの態様において、水または他の水性ビヒクル中で調製された、経口投与用の薬学的組成物の液体製剤は、メチルセルロース、アルギナート、トラガカント、ペクチン、ケルギン、カラゲナン、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、およびポリビニルアルコールなど様々な懸濁化剤を含んでよい。また、本発明の薬学的組成物の液体製剤には、活性化化合物と共に湿潤剤、甘味剤、ならびに着色剤および矯味剤を含む、液剤、乳剤、シロップ剤、およびエリキシル剤も含まれ得る。薬学的組成物の様々な液体製剤および粉末製剤は、処置しようとする哺乳動物の肺に吸入させるための従来の方法によって調製することができる。

【0325】

本発明の1つの態様において、注射用の薬学的組成物の液体製剤は、植物油、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、乳酸エチル、炭酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、エタノール、多価アルコール、すなわち、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど様々な担体を含んでよい。いくつかの態様において、組成物は、クエン酸/スクロース/Tween担体を含む。静脈注射の場合、抗真菌剤および生理学的に許容される賦形剤を含む薬学的製剤が注入される点滴法により、組成物の水溶性型を投与することができる。生理学的に許容される賦形剤には、例えば、5%デキストロース、0.9%生理食塩水、リンガー溶液、または他の適切な賦形剤が含まれ得る。組成物の適切な不溶型は、水性基剤、または長鎖脂肪酸のエステル、例えばオレイン酸エチルのような薬学的に許容される油性基剤中の懸濁剤として調製および投与することができる。

10

【0326】

本発明の1つの態様において、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体中に、約0.1~90重量%(1~20%または1~10%など)の本発明の抗CD154抗体を含む。

【0327】

本発明の1つの態様において、各薬学的組成物中の本発明の抗CD154抗体の最適な百分率は、製剤それ自体ならびに具体的な病理および相互に関係がある治療レジメンにおいて望ましい治療の効果によって変動する。薬学的製剤は、当技術分野において十分に確立している。医学分野の当業者に公知である従来の方法を用いて、対象に薬学的組成物を投与することができる。

20

【0328】

したがって、本発明の薬学的組成物は、徐放製剤に関する。徐放、または制御放出もしくは持続放出とは、対象への投与後、ある期間に渡ってポリペプチドまたは抗体薬物などの活性薬物を放出する薬物製剤を意味する。ポリペプチド薬物の徐放は、所望の時間の範囲(例えば、薬物製剤によって、分、時間、日、週またはそれより長い時間)に渡って実施することができ、これは、実質的に投薬単位全体が、血流を介した即時吸収または即時分布のために利用可能である標準的製剤とは異なる。特定の態様において、徐放製剤は、例えば、8時間もしくはそれ以上、12時間もしくはそれ以上、24時間もしくはそれ以上、36時間もしくはそれ以上、48時間もしくはそれ以上、60時間もしくはそれ以上、72時間もしくはそれ以上、84時間もしくはそれ以上、96時間もしくはそれ以上、またはさらに、例えば、1週間もしくは2週間またはそれ以上、例えば、1ヶ月またはそれ以上維持される、循環血中薬物のレベルを単回投与からもたらし得る。徐放組成物は、本発明の一価の抗CD154抗体を含んでよい。さらなる態様において、一価の抗体は、ヒト化抗体または完全ヒト抗体である。さらなる態様において、抗CD154抗体、抗CD154抗体は、本明細書において説明する低いエフェクター機能を有する抗体である。

30

【0329】

本発明のいくつかの態様において、薬学的組成物は、免疫抑制性化合物または免疫調節性化合物をさらに含む。例えば、このような免疫抑制性化合物または免疫調節性化合物は、次の内の1つでよい：CD28を介したT細胞共刺激シグナル伝達を妨害する作用物質；カルシニユリンシグナル伝達を妨害する作用物質、コルチコステロイド、抗増殖剤、ならびにCD45、CD2、IL2R、CD4、CD8およびRANK FcR、B7、CTLA4、TNF、LT、およびVLA-4を非限定的に含む、免疫細胞の表面で発現されるタンパク質に特異的に結合する抗体。

40

【0330】

本発明のいくつかの態様において、免疫抑制性化合物または免疫調節性化合物は、タクロリムス、シロリムス、ミコフェノール酸モフェチルまたはその活性型のミコフェノール酸、ミゾルピン(mizorubine)、デオキシスベルグアリン、プレキナルナトリウム、レフルノミド、ラパマイシン、またはアザスピランである。

【0331】

本発明の他の態様において、本発明の抗体またはそれらを含む薬学的組成物は、単独で、またはラベルおよび投与用の取扱い説明書を伴うキットの一部として、容器、パッケー

50

ジ、またはディスペンサー中に含まれてよい。

【0332】

投与経路および送達経路

本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、医学的に許容される任意の様式で対象に投与することができる。本発明の目的において、「投与」とは、当業者に公知である、抗体、抗体断片、または薬学的組成物を投与する標準的方法のいずれかを意味し、本明細書において提供される例に限定されるべきではない。

【0333】

本発明のいくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、髄内、脳室内、硬膜外の内部、動脈内、血管内、関節内、滑液包内、胸骨内、くも膜下腔内、肝臓内、脊髄内、腫瘍内、頭蓋内への注射によって；腸内、肺内、粘膜内、子宮内、もしくは舌下の投与経路によって、または局所的に(例えば、炎症もしくは腫瘍増殖の部位)、対象に投与することができる。

10

【0334】

本発明のいくつかの態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、経口的もしくは経鼻的に、または吸入経路、眼経路、直腸経路、もしくは局所的経路によって対象に投与することができる。

【0335】

より具体的な態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、カプセル剤、錠剤、水性の懸濁剤または液剤の形態で経口的に対象に投与することができる。

20

【0336】

より具体的な態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、クリーム剤または軟膏剤などの塗布により、局所的に対象に投与することができる。

【0337】

本発明の他の態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物はまた、ネブライザー、乾燥粉末吸入器、または定量吸入器を用いて吸入によって投与することもできる。

【0338】

本発明のさらなる態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、持続放出投与によって、手術の間に直接適用される侵食性埋め込み剤の蓄積注射のような手段によって、または輸液ポンプもしくは生体適合性の持続放出埋め込み剤の対象への埋め込みによって、対象に投与することができる。

30

【0339】

より具体的な態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、デポ注射剤(injectable depot)の投与経路によって、例えば、1ヶ月、3ヶ月、または6ヶ月の蓄積注射可能または生分解性の材料および方法を用いることによって、対象に投与することができる。

【0340】

より具体的な態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、抗体、抗体誘導体、または薬学的組成物を含む経皮パッチを対象の皮膚に貼付し、一般的にパッチ1枚当たり1~5時間、そのパッチを対象の皮膚と接触させることによって、対象に投与することができる。

40

【0341】

本発明の他の態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、医学的に許容される、体重当たりの任意の用量および任意の投薬頻度で対象に投与することができる。許容される投薬量は、約0.01~200mg/kg(対象の体重)の間の範囲を含む。

【0342】

本発明の抗体または薬学的組成物を用いる方法のいずれかにおいて、抗体または薬学的組成物は、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、もしくは6日毎、毎週、毎月、またはそ

50

の任意の分数もしくは倍数の間隔で、単回投与または複数回投与で対象に投与することができ、さらに、当業者によって決定されるように、毎日～隔月に及ぶ間隔で対象に繰り返して投与することもできる。

【0343】

本発明の抗体または薬学的組成物を用いる方法のいずれかにおいて、結合タンパク質、抗体、またはそれらを含む薬学的組成物は、医学的に必要とされる長さの期間、数日または数週～対象の一生に及ぶ間隔で、それを必要とする対象に投与することができる。さらなる態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、毎日～隔月に及ぶ間隔で対象に繰り返して投与することができる。

【0344】

本発明の1つの態様において、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、所望の場合は、所望の1日総用量を実現するために、1日当たり複数回の投与で投与することができる。処置方法の有効性は、障害の公知の徴候または症状に関して対象をモニターすることによって評価することができる。

【0345】

本発明のすべての態様に関して、所望の効果をもたらすのに有効である、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物の投薬量および投与速度は、処置しようとする疾患の性質、対象の大きさおよび年齢、処置の目標、使用される個々の薬学的組成物、活性物質の薬物動態、ならびに処置を行う担当医の判断など様々な因子に依存する。

【0346】

したがって、本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、所期の目的を達成するのに有効な量で投与される。治療的有效量とは、疾患の症状を予防、緩和、もしくは改善するか、または処置される対象の生存を延長するのに有効な抗体の量を意味し得る。治療的有效量は、本抗体の投与の用量および投薬スケジュールを変更することによって実現することができる。

【0347】

本発明の抗CD154抗体および本発明の薬学的組成物は、対象が短時間曝露される抗原、例えば、ただ1日の処置で投与される外因性抗原に対する免疫応答を防止するような特定の要件(indications)のために単回投薬量として投与することができる。このような療法の例には、本発明の抗体断片と、治療物質、例えば抗原性薬剤、アレルゲンもしくは血液製剤、または遺伝子療法ベクターとの同時投与が含まれる。抗原が長期に渡って存在する見通しの場合、例えば、移植された組織または長期に渡って投与された抗原性薬剤に対する免疫反応を制御する際、本発明の抗体断片または薬学的組成物は、医学的に必要とされる長さの期間、数日または数週～対象の一生に及ぶ間隔で投与される。

【0348】

本明細書において説明する方法のいずれかにおいて、抗体または薬学的組成物は、第2の作用物質と共に対象に投与され得る。特定の態様において、この作用物質は、治療物質、例えば、免疫調節剤または免疫抑制剤などである。免疫調節剤または免疫抑制剤は、次のうちいずれかでよい：

(a)CD28を介したT細胞共刺激シグナル伝達を妨害する作用物質；

(b)カルシニユリンシグナル伝達を妨害する作用物質；

(c)コルチコステロイド、

(d)抗増殖剤；ならびに

(e)CD45、CD2、IL2R、CD4、CD8およびRANK FcR、B7、CTLA4、TNF、LT、およびVLA-4を非限定的に含む、免疫細胞の表面で発現されるタンパク質に特異的に結合する抗体。免疫抑制性化合物または免疫調節性化合物は、例えば、タクロリムス、シロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、ミゾルピン(mizorubine)、デオキシスベルグアリン、プレキナルナトリウム、レフルノミド、ラパマイシン、またはアザスピランでよい。抗体および第2の作用物質は、同時または逐次的に投与されてよい。

【0349】

10

20

30

40

50

場合によっては、本発明の1つまたは複数の核酸を、それを必要とする対象に投与することが有利な場合がある。周知の方法に従って本発明の少なくとも1つの核酸を投与する段階を含む、本発明の治療方法および診断方法は、本発明の範囲に含まれる。

【0350】

本発明の1つの態様において、前述の方法によって処置され得る対象は動物である。好ましくは、動物は哺乳動物である。処置され得る哺乳動物の例には、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯動物(ラット、マウス、ハムスター、およびモルモットを含む)、雌ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、およびネコが含まれるがそれらに限定されるわけではない。好ましくは、哺乳動物はヒトである。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0351】

本発明は、以下の実施例に基づくと、より良く理解することができる。しかしながら、当業者は、考察する特定の方法および結果が、本明細書において説明する本発明の例示にすぎないことを容易に理解すると考えられる。

【0352】

実施例

以下の実施例は、本発明の方法および生成物を例示する。分子生物学の分野において通常認められ、当業者には明らかである、説明される条件およびパラメーターの適切な修正および適応は、本発明の精神および範囲に含まれる。

【0353】

実施例1：SLAMによる抗ヒトCD154抗体の作製

選択的リンパ球抗体法(SLAM)(Babcock et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci, 93, 78 43-7848; WO 92/02551; de Wildt et al., 1997, J. Immunol. Methods, 207:61-67、および Lagerkvist, et al., 1995, BioTechniques 18:862-869)を用いて、抗ヒトCD154抗体を同定および単離した。SLAMにより、インビボでの免疫応答の間に生成される高親和性抗体を産生する細胞を任意の種から単離することが可能になる。次いで、単離された個々の抗体産生細胞をクローンとして増殖させ、次に、抗CD154抗体を産生するクローンを求めてスクリーニングし、次に、可変重鎖(V_H)遺伝子および可変軽鎖(V_L)遺伝子の配列を続いて同定する。具体的なスクリーニング方法は、WO 04/051268において詳述されている。このようにして、ヒトCD154に対する抗体に関して陽性であるB細胞を単離した。

【0354】

SLAM技術を用いて、いくつかのラット抗ヒトCD154抗体を同定し、単離した(図12)。以下の実施例で説明するようにして、これらの抗体の内の1つであるCA081 00342(「342抗体」)をヒト化した。そのDNAおよび推測されるアミノ酸配列を図2に示す。この抗体をコードする遺伝子をクローン化した。

【0355】

実施例2：CA081 00342のヒト化 - 342.G2の作製

CDRをヒト生殖系列フレームワーク上にグラフィティングすることによって、SLAM抗体342をヒト化した。ラット抗体(ドナー)配列とヒト生殖系列(アクセプター)フレームワークのアライメントを、設計されたヒト化配列と共に図9に示す。選択した軽鎖生殖系列アクセプター配列は、ヒトVK1 2-1-(1)012のV領域およびJK1 J領域(V BASE, MRC Centre for Protein Engineering, UK; SEQ ID NO : 35およびSEQ ID NO : 36)であった(図3)。選択した重鎖生殖系列アクセプター配列は、ヒトVH3 1-1 3-66のV領域およびJK4 J領域(V BASE, MRC Centre for Protein Engineering, UK; SEQ ID NO : 37およびSEQ ID NO : 38)であった(図3)。さらに、別のVHアクセプターフレームワーク、すなわちヒトVH4 1-1 4-59配列(SEQ ID NO : 39およびSEQ ID NO : 40)も選択した(図3)。ドナーからアクセプター配列にグラフィティングされたCDRは、Chothia/Kabatの組合せ定義が使用されるCDR-H1を除いては、Kabatによって定義されるとおりである(Kabat et al. Sequence of proteins of immunological interest (1987). Bethesda MD, National Institutes of Health, US)(WO 91/09967を参照されたい)。CDRのみがドナー抗体からアクセプターフレームワーク上に移植されるグラフトに関して、重要なドナーフレームワーク残基も同様に含まれる変型を構築した

10

20

30

40

50

。これらの残基は、WO 91/09967に記載されているものに基づいた方法を用いて同定した。例えば、軽鎖グラフトVK1 gL4は、38位、71位、および85位にドナー残基を含み;重鎖グラフトVH3 gH1は、24位、48位、49位、73位、および78位にドナーフレームワーク残基を含み;重鎖グラフトVH4 gH1は、48位、71位、および78位にドナーフレームワークを含む。これらのすべてのグラフトの配列を図9に示す。

【0356】

これらのV領域配列をコードする遺伝子は、契約を結んだ遺伝子合成会社(Entelechon GmbH; DNA 2.0; Blue Heron)によって、標準的な分子生物学技術を用いて設計および構築された。グラフトされた変種を作り出すための改変は、PCRを用いた標準的なオリゴヌクレオチド指定変異誘発を用いて行った。哺乳動物用細胞発現ベクターを用いた発現を可能にするために、元のラット抗体に由来するシグナルペプチド配列を元の遺伝子設計に含めた。

10

【0357】

グラフトされた軽鎖遺伝子を、ヒトC- 定常領域(Km3アロタイプ)をコードするDNAを含む軽鎖発現ベクター中にサブクローニングした。グラフトされた重鎖遺伝子を、ヒンジ安定化変異S241P (Angal et al, Mol. Immunol.1993, 30(1):105-8)を含むヒト -4定常領域をコードするDNAを含むヒト -4発現ベクター中にサブクローニングした。任意の適切な発現ベクターが使用され得る。また、元のラット抗体遺伝子もこれらのベクター中にサブクローニングして、アッセイ法のベンチマークとして、ラットV領域/ヒトC領域キメラ抗体を発現するプラスミドを作り出した。

20

【0358】

CHO細胞中に軽鎖遺伝子プラスミドおよび重鎖遺伝子プラスミドを同時トランスフェクションすることにより、IgGの発現およびBiacore(登録商標)によるヒトCD154結合の解析が可能になった。

【0359】

大腸菌での発現および一価Fab'としての活性を解析するために、重要な構築物の遺伝子を発現ベクターpTTOD(Fab)中にサブクローニングした(WO 03/48208、WO 03/031475)。サブクローニングは次の2段階プロセスで実行した:最初に、VK遺伝子断片をEcoRV-BsiWI断片としてクローニングした;次に、VH遺伝子断片をPvuII-XhoI断片としてクローニングした。このプロセスにより、OmpAタンパク質に由来するシグナルペプチドをコードするDNAが、軽鎖および重鎖の両方をコードする遺伝子に融合されて、翻訳されたタンパク質が細菌のペリプラズムに分泌されるようになる。結果として得られる発現プラスミドを大腸菌K-12株W3110中に形質転換し、小規模な振盪フラスコでの誘導実験において、および高細胞密度発酵のために使用した。

30

【0360】

(表1) Biacore(登録商標)による342Fab構築物の親和性(1L発酵から精製したFab)

グラフト	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	KD(pM)
gL4gH1	1.53E+07	6.97E-05	4.55E-12	4.55

【0361】

最適なグラフトの選択は、アッセイ法における活性と大腸菌発酵におけるFabの発現レベルの両方を考慮に入れて行った。Biacore(登録商標)による親和性決定の例を表1に示す。これに基づいて、グラフトgL4gH1を選択した。

40

【0362】

Fab'型のグラフトgL4gH1をコードするプラスミドを作製した。このグラフトの挿入挿入物のDNA配列を図8に示す(SEQ ID NO:41)。また、図8は、F(ab)₂断片を作製するために使用できる、Fab断片を発現させるための挿入物の配列(SEQ ID NO:28)も提供する。

【0363】

実施例3: 部位特異的変異誘発による、アグリコシル化HU5C8抗体およびアグリコシル化HU342抗体の作製

50

後続の実験において使用するアグリコシル化hu5c8抗体およびアグリコシル化hu342抗体は、標準的な組換えDNA技術を用いて作製した。アグリコシル化hu5c8は、エフェクター機能をさらに低下させるために、以前に使用されたIgG1 Fcドメインの代わりにhuIgG4 Fcドメインを用いた点を除いて、US2006/0193856で説明されているようにして実質的に作製した。アグリコシル化hu5c8の軽鎖配列を図13に示す(SEQ ID NO : 62、SEQ ID NO : 63、およびSEQ ID NO : 64)。アグリコシル化hu5c8の重鎖は、CH2(T299A、Kabat EU)およびヒンジ(S228P Kabat EU)ドメイン中に、部位特異的変異誘発によって起こされた2つの変異を含む(図14;SEQ ID NO : 65、SEQ ID NO : 66、およびSEQ ID NO : 67)。T299A変異により、CH2ドメイン中のN-グリコシル化部位が修飾され、その結果、それはもはやN-グリコシル化酵素の基質ではなく、分子がアグリコシル化される。

10

【0364】

アグリコシル化hu342抗体は、342Fab断片ベクターから誘導した。ヒトシグナル配列および適切なヒト定常ドメイン配列の付加によって、この配列を修飾した。アグリコシル化hu342抗体はまた、huIgG4 Fcドメインも含む。アグリコシル化hu342の軽鎖配列を図15に示す(SEQ ID NO : 68、SEQ ID NO : 69、およびSEQ ID NO : 70)。アグリコシル化hu342の重鎖は、CH2(T299A、Kabat EU)およびヒンジ(S228P Kabat EU)ドメイン中に、部位特異的変異誘発によって起こされた2つの変異を含む(図16;SEQ ID NO : 71、SEQ ID NO : 72、およびSEQ ID NO : 73)。T299A変異により、CH2ドメイン中のN-グリコシル化部位が修飾され、その結果、それはもはやN-グリコシル化酵素の基質ではなく、分子がアグリコシル化される。アグリコシル化hu5c8およびアグリコシル化hu342の両方とも、CHO細胞において安定に発現される。

20

【0365】

実施例4：CD154への結合：結合親和性の測定

Biacore(登録商標)技術は、リアルタイムで生体分子間の結合をモニターし、標識化を必要としない。反応体の内の1つは、リガンドと呼ばれ、直接固定されるか、または固定された表面上で捕捉されるのに対し、他方は分析物と呼ばれ、捕捉された表面の上を、溶液状態で流れる。分析物がリガンドに結合して表面上で複合体を形成すると、センサーは、センサー表面の質量変化を検出する。これは、結合プロセスに対応する。分析物が緩衝液に置換される場合、解離プロセスがモニターされる。親和性Biacore(登録商標)アッセイ法において、リガンドは342抗体のような抗CD154抗体であり、分析物はヒトCD154の細胞外ドメインである。

30

【0366】

この方法の詳細は以下のとおりである。

機器：Biacore(登録商標) 3000、Biacore AB、Uppsala、Sweden。

センサーチップ：CM5 (研究グレード) カタログ番号：BR-1001-14、Biacore AB、Uppsala、Sweden。チップは4 で保管した。

BIA標準化溶液：70% (w/w) グリセロール。BIA維持キットの一部

カタログ番号：BR-1002-51、Biacore AB、Uppsala、Sweden。BIA維持キットは4 で保管した。

アミンカップリングキット：カタログ番号：BR-1000-50、Biacore AB、Uppsala、Sweden。エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド(EDC)。蒸留水に溶かして75mg/mLにし、-70 にて200 μ Lのアリコートで保存した。

40

N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)。蒸留水に溶かして11.5mg/mLにし、-70 にて200 μ Lのアリコートで保存した。1Mエタノールアミンヒドロクロリド-NaOH pH8.5。-70 にて200 μ Lのアリコートで保存した。

緩衝液：泳動用緩衝液は、HBS-EP(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% Surfactant P20)である。カタログ番号：BR-1001-88、Biacore AB、Uppsala、Sweden。緩衝液は4 で保存した。固定化緩衝液は、Acetate 5.0(10mM酢酸ナトリウム、pH5.0)である。カタログ番号：BR-1003-51、Biacore AB、Uppsala、Sweden。緩衝液は4 で保存した。

50

リガンド捕捉 : Affinipure F(ab')₂断片ヤギ抗ヒトIgG、Fab'断片特異的(カタログ番号 : 109-006-097)またはFc断片特異的(カタログ番号 : 109-006-098)、Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, USA)。反応物は4 で保存した。

リガンド : 抗CD154抗体。

分析物 : ヒトCD154の組換え細胞外ドメイン。材料をリン酸緩衝化生理食塩水に溶かして2 mg/mL(40 μM)に調製し、4 で保存し、アッセイ法のためにHBE-EP泳動用緩衝液中で希釈した。典型的には、親和性アッセイ法のために倍加希釈によってCD154を約1nM ~ 約100pMに希釈した。

再生溶液 : 11.6Mの原液(BDH、Poole、England カタログ番号 : 101254H)を蒸留水で希釈して調製した40mM HCl。50 mMの原液を蒸留水で希釈して調製した5mM NaOH。カタログ番号 : BR-1003-58、Biacore AB、Uppsala、Sweden。

アッセイ方法 : Biacore(登録商標)3000(Biacore AB)を用いて、BIA(Biomolecular Interaction Analysis)を実施した。Affinipure F(ab')₂断片ヤギ抗ヒトIgG(Fc断片またはFab'断片特異的)(Jackson ImmunoResearch)を、6000応答単位(RU)にほぼ等しい()捕捉レベルまでアミンカップリング化学反応によってCM5 Sensor Chip上に固定した。HBS-EP緩衝液(10mM HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% Surfactant P20、Biacore AB)を、10 μl/分の流速で泳動用緩衝液として使用した。固定された抗ヒトIgG-Fc(または抗ヒトIgG Fab')表面に捕捉されると、200 RUにほぼ等しい()シグナルを生じるような濃度で抗CD154抗体またはFab断片を使用した。捕捉された抗体に対して様々な濃度のヒトCD154を滴定した。90 μLのCD154を表面に注入し(結合段階)、240秒の解離段階を続けた。流速はすべて30 μL/分であった。流速10 μL/分で40mM HCl 10 μLを2回注入、続いて5mM NaOH 5 μLを注入することによって、表面を再生した。標準手順に従ってBIA評価ソフトウェア(バージョン3.2)を用いて、バックグラウンドを除去した結合曲線を解析した。フィッティングアルゴリズムから動態パラメーターを決定した。

【 0 3 6 7 】

この方法を用いて、CD154タンパク質またはその断片に対する本発明の抗体、抗体誘導体、または抗体断片のいずれかの親和性を評価することができる。SLAMによって単離した抗CD154抗体のBiacore(登録商標)によって得られるKd値を図12および図18に示す。

【 0 3 6 8 】

実施例5 : CD40結合の阻害

フローサイトメトリーに基づいたアッセイ法を用いて、CD154を発現するD1.1細胞への標識されたCD40の結合を評価した。D1.1ジャーカット細胞(American Type Culture Collection)を、10% (v/v)ウシ胎児血清(FCS)、2mMグルタミン(Invitrogen、23030024)、1mMピルビン酸ナトリウム(Invitrogen、11360-039)、1% (v/v)D-(+)-グルコース(Sigma、G8769)および10mM HEPES(Sigma、H0887)を含むRPMI1640培地(Gibco、31870-025)中で維持した。アッセイ法の際、段階的に希釈した抗CD154抗体の存在下または不在下で、室温で15分間、D1.1細胞100,000個をRPMI1640培地+10% FCS 100 μL中でインキュベートした。次いで、hCD40-mFc-PE(Alexis Corp、ANC-504-050)の1:75希釈物5 μLを添加し、室温でさらに30分間インキュベートした。1% (w/v)ウシ血清アルブミン(BSAフラクションV、Serologicals Proteins Inc、81-068-5)および0.02% (w/v)アジ化ナトリウム(BDH、103692K)を含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中で2回洗浄した後、200 μLのPBS/1% BSA/0.02%アジ化ナトリウム中に細胞を再懸濁し、Becton Dickinson FACScanを用いてフローサイトメトリーを実施した。すべての場合において、幾何平均蛍光(FL2)の値を評価した。hCD40-mFc-PE結合の阻害は、次の式を用いて、抗体の不在下でのシグナル(0%阻害)およびhCD40-mFc-PEの不在下でのシグナル(100%阻害)と比べて計算した。

$$\left[\frac{0\% \text{阻害} - \% \text{試験}}{0\% \text{阻害} - 100\% \text{阻害}} \right] \times 100$$

【 0 3 6 9 】

Activity Baseパッケージの一環としてXLfitを用いて、データからIC50値を得た。

【0370】

SLAMによって単離した抗CD154抗体のCD40結合のIC50値を図12および図18に示す。

【0371】

実施例6：競合結合アッセイ法

フローサイトメトリーに基づいたアッセイ法を用いて、CD154を発現するD1.1細胞への抗CD154抗体の結合を評価した。D1.1ジャーカット細胞(American Type Culture Collection)を、10% (v/v) ウシ胎児血清(FCS)、2mMグルタミン(Bio Whittaker, 17-605E)、および1ペニシリン-ストレプトマイシン(Mediatech, 30002107)を含むRPMI 1640培地(Gibco, 31870-025)中で維持した。アッセイ法の際、段階的に希釈した抗CD154抗体およびビオチン化抗CD154Fab(クローン342)の存在下または不在下で、4 で2時間、D1.1細胞100,000個を10mLのPBS、0.1% BSA、0.02% アジ化ナトリウム(FACS緩衝液)中でインキュベートした。これらの細胞をFACS緩衝液中で3回洗浄した。洗浄の間には290 × gで3分間、遠心分離した。150 μM FACS緩衝液に溶かしたストレプトアビジン(streptavidin)-R-フィコエリトリン結合体(Jackson Immunoresearch, 016-110-084)の1:500希釈物を添加し、4 で1時間、細胞をインキュベートした。これらの細胞を1回洗浄し、3%ホルムアルデヒドを含むPBS中、室温で10分間、固定した。細胞をFACS緩衝液に再懸濁し、FacsCalibur(BD)において移動させた。すべての場合において、幾何平均蛍光(FL2)の値を評価した。ビオチン342Fab結合を競合抗体の濃度に対してプロットして、シグモイド阻害曲線を得た。これらの曲線は、GraphPad Prismを用いて、4パラメーター曲線フィットにフィットさせた。このアッセイ法で得られたIC₅₀値を図18に示す。

【0372】

実施例7：ICAM-1上方制御アッセイ法

抗CD154抗体がCD40L:CD40細胞表面相互作用を阻害する能力を、インビトロの共培養力価検定において測定した。CD40がCD154(CD40L)と連結(例えば結合)すると、Bリンパ球が活性化されて細胞表面のCD54(ICAM-1)が上方制御され、この接触依存性のCD40L:CD40によるB細胞活性化は、抗CD154によって阻止することができる。手短に言えば、CD154を発現するD1.1ジャーカットTリンパ腫細胞(CRL-10915, American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA, USA)およびCD40を発現するラモス(Ramos)2G6.4C10Bリンパ腫細胞(CRL-1923, ATCC)を、1:4の比率で、5% CO₂を含む37 インキュベーター中で一晩共培養し、抗CD154Fabまたは対照の完全なAb(hu5C8)を滴定した。アッセイ法は、96ウェルの丸底プレート中で、RPMI完全培地(10% FBS、1% L-グルタミン、1% ピルビン酸ナトリウム、および10mM HEPES pH6.8を含むRPMI, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)中1 × 10⁶細胞/mlの濃度で実施した。翌日、1% BSAおよび0.1% アジ化ナトリウムを含むPBSに溶かした、それぞれ1:100および1:200の濃度のCD20 FITC(555622番)およびCD54 APC(559771番)(BD Pharmingen(San Diego, CA, USA)社製)で、4 で1時間、細胞を染色した。これらの細胞を洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、FACSscan Calibur Cytometer (BD Biosciences)を用いて解析した。抗CD154(CD40L)の濃度に対するラモス細胞(ダブルポジティブ細胞)の幾何平均蛍光を、DeltaGraphソフトウェア(Red Rock Software, Salt Lake City, UT, USA)を用いて、4パラメーター曲線にフィットさせた(図12および図18)。IC50値を用いて、抗CD154抗体の相対的力価を決定した。

【0373】

実施例8：免疫応答のカニクイザルモデルにおける活性

インビボでの活性を実証するために使用されるモデルは、Gobburu et al. (1998) J Pharmacol Exp Therapeutics 286:925において説明されている。破傷風トキソイド(TT)0.5mLの筋肉内単回投与による抗原チャレンジより4時間前に、生理食塩水、Hu5c8抗体、または342Fab'-PEGの用量応答(dose response)のいずれかの静脈内単回投与をカニクイザルに施した。各処理群は、雄3匹および雌3匹を含んだ。30日目に、阻害物質の2回目の投与を行い、TTで動物を再び抗原チャレンジした(二次応答)。IgGおよびIgMの両方の抗TT力価を解析するために、最長50日間、選択した時間帯に血液試料を採取した(図19および図12)。

データから、342Fab'-PEGがIgGおよびIgMのTTに対する免疫応答を用量依存的に阻害することが示される。

【0374】

また、カニクイザルにおけるIgGの抗TT力価を、様々な形態の抗CD154抗体の単回投与(hu5c8、アグリコシル5c8、およびアグリコシル342の場合は20mg/kg、ならびに342Fab'-PEGおよび342DFM-PEGの場合は40mg/kg)による処理の後に測定した(図20)。評価した抗体すべてにおいてTT免疫応答の阻害が観察された。

【0375】

実施例9：蛍光活性化細胞選別交差ブロッキングアッセイ法

本発明の抗CD154 Fab'断片の結合特性を、交差ブロッキング抗体アッセイ法を用いて研究した。手短かに言えば、CD154を発現するD1.1ジャーカット細胞を、培地または10 μ g/mlの第1の非標識抗CD154 Fab'のいずれかと共に室温で60分間インキュベートした。洗浄せずに、Alexa Fluor 488で標識した第2の抗CD154 Fab'の最適希釈物(300ng/ml)を60分間添加した。次いで細胞を洗浄し、フローサイトメトリーによって解析した。第1のFab'および第2のFab'が同じエピトープに結合する場合、第1のFab'は、第2のFab'の結合を競合的に阻止すると考えられる。これら2つの抗体が異なるエピトープに結合する場合、第1のFab'は、第2のFab'の結合を阻止しないと考えられる。試験される標識された第2のFab'が342である場合、342Fab'は338Fab'(図23B)、381Fab'(図23D)、および335Fab'(図23G)によって交差ブロッキングされるが、295 Fab'(図示せず)にも、402Fab'(図23C)にも、300Fab'(図23E)にも、303Fab'(図23H)にも、294Fab'(図23F)にも交差ブロッキングされないことを実証することができる。標識されたFab'がhu5c8である場合、338Fab'(図24A)、402Fab'(図24B)、381Fab'(図24C)、303Fab'(図24D)、335Fab'(図24E)、300Fab'(図24F)、および294Fab'(図24G)による交差ブロッキングを実証することができる。A33(アイソタイプを一致させた対照抗体)を用いた試験により、非特異的交差ブロッキングがないことが確認される(図23Aおよび図24H)。抗体342および抗体hu5c8は、どちらが非標識(第1)Fab'および標識(第2)Fab'であるかに関わらず、CD154に結合するために互いに競合した。

【0376】

実施例10：抗体結合のBIACORE(登録商標)解析

可溶性CD154タンパク質(sCD154)(細胞外ドメイン(extracellular domain);ECD)への342抗体およびhu5c8抗体の結合をBiacore(登録商標)で解析したところ、342は、sCD154に2番目に添加された場合、sCD154に結合しているhu5c8と置き換わることが示された(図25AおよびB)。5c8は、sCD154に2番目に添加された場合、sCD154から342を移動させることができた(図25C)。抗体338は、hu5c8競合アッセイ法において、非相互的な結果に関して342と同様に挙動した。

【0377】

Hu5c8Fab'は、342完全長(FL)/sCD154複合体に結合することができる(図25D)。この結果から、342FLが最初に添加された場合、hu5c8 Fab'は342FL結合部位と競合しないことが示唆される。理論に拘束されるわけではないが、これらの結果から、342によるsCD154三量体の1つまたは2つのアームの結合は、「自由な」アームへのhu5c8結合を妨害しないことが示唆される。

【0378】

hu5c8Fab'の後に342Fab'が続く場合、結合がわずかに(約20RU)増加する(図25E)。この結果から、hu5c8Fab'が342Fab'の結合を阻止したか、または342Fab'が、捕捉されたsCD154上のhu5c8Fab'を置換したかいずれかの可能性が持ち上がる。

【0379】

342Fab'もhu5c8Fab'も、CD40:sCD154複合体に結合もせず、タンパク質アッセイ法における複合体の解離に影響を及ぼしもしない。どちらのFab'もCD40:sCD154複合体に結合できないことから、複合体が3つのsCD154アームすべてを使用すること、または複合体が「自由な」アームへのどちらか任意のFab'の接近を立体的に妨げることのいずれかが示唆される。

10

20

30

40

50

【0380】

実施例11：ヒト血小板活性化

アッセイ法1

血小板凝集は、公開されているアッセイ法(例えば、Florian et al. (2005) *Thrombosis Hemostasis* 93:1137)を用いて測定することができる。1つのアッセイ法において、正常なドナーの血小板に富む血漿から、BSAでコーティングしたチューブに入れたHEPES緩衝化生理食塩水中に血小板を洗い出し、1マイクロリットル(μl)当たり250,000個に調整した。次いで、洗浄した血小板を血小板凝集計キュベット(Chrono-Log 490D)中にピペットで分注し、ブランク用のHEPES(アッセイ用)緩衝液を用いて、トレースシグナルをゼロパーセントの凝集として較正した。この機器中では、キュベットは37.0 に維持し、シリコン処理したマグネチックバーは1000rpmで血小板を攪拌する。完全に形成された免疫複合体(すなわち、1:1の化学量論比(rhsCD40Lを三量体として扱う場合)の抗体および組換えヒト可溶性CD40L(rhsCD40L))を血小板に添加し、溶液の光学濃度に由来するトレースとして凝集を評価した。具体的には、キュベットへの添加後、sCD40Lの最終濃度が $10\mu\text{g/ml}$ となり、IgG抗体の最終濃度が $27.8\mu\text{g/ml}$ またはFab'-PEGの場合には $16.7\mu\text{g/ml}$ となるように、洗浄した血小板の懸濁液 $285\mu\text{l}$ に免疫複合体 $15\mu\text{l}$ を添加した。このデータから、完全なIgG抗CD40L抗体Hu5c8の存在下で凝集は起こるが、342Fab'-PEGの場合は起こらないことが示される(図26)。

10

【0381】

アッセイ法2

WO 07/59332において説明されている別のアッセイ法において、血小板凝集は、血小板を血小板活性化物質(例えば、アデノシン2リン酸(ADP)、コラーゲン、トロンピン、トロンボキサン、好中球エラスターゼ(neutrophil elastase)、p-セレクチン、またはコンブルキシシン(convulxin)と接触させ、活性化された血小板を抗CD154抗体と接触させ、次いで、活性化された血小板を架橋物質(例えば、可溶性CD154(sCD154)、抗ヒトIgG抗体、抗hFc抗体、RF、Fcレセプター陽性アクセサリー細胞、可溶性プロテインA、または可溶性ヒトFcレセプター)と接触させることによって測定される。その場合、凝集は、血小板の凝集を示す血小板の沈降に基づいて定量される。凝集アッセイ法は、多血小板血漿(PRP)を用いて実施した。約50mLの全血を、0.5mLの3.8%クエン酸ナトリウムを含む4.5mLバキュテナーチューブ中に一定分量ずつ採取した。200gで10分間、抗凝固処理血液を遠心分離し、上清を回収することによって、PRPを調製した。アッセイ法を実施するために、乏血小板血漿(PPP)のみを含むキュベットを用いて、Biodata 4チャンネル血小板凝集プロファイラー(PAP-4; Biodata Corp., Hatboro, PA)をブランク測定した。約 $2\sim 5 \times 10^8$ 個/mLの血小板を含む $350\mu\text{L}$ のアリコートしたPRPを、攪拌棒を含むキュベットに添加した。総体積 $100\mu\text{L}$ の抗CD40L抗体、ヒトIgG、正常なヒト血清、CD40-Fc、または抗hFcを添加した。添加されたキュベットを機械中に設置し、ADPを添加する前に反応成分を混合した。

20

30

【0382】

最適以下濃度のADP $50\mu\text{l}$ (最終濃度はそれぞれの試料によって異なる)を添加して、凝集を開始させた。凝集プロファイラーは、同時に試験できる4つの口を有する。ADP添加後4分間、各試料の凝集トレース図を作成した。トレーシングの最後に、この機器は、試料を通過する光の透過をPPPブランクを通過する光の透過と比較することによって、凝集率(%)を算出する。各実験の初めに滴定を実施し、その後の試験は最適以下のADP濃度で実施した。

40

【0383】

このアッセイ法で得られた結果を図27に示す。PRPは、1名の健常個体から得た。このドナーに対して最適以下であると判定した $0.75\mu\text{M}$ ADPを用いて、凝集を誘導した。陽性対照の抗CD154抗体および陰性対照のhIgGは $200\mu\text{g/mL}$ で評価し、sCD154は $30\mu\text{g/mL}$ で評価した。PRPを含むキュベットに添加する前に、少なくとも20分間、抗CD154抗体またはhIgGを組換えsCD154と混合した。棒は2つのデータポイントの平均値および標準偏差を示す。これらの結果から、陰性対照のヒトIgG(hIgG)およびsCD154は共に、血小板凝集に対して影

50

響を及ぼさないが、陽性対照の抗CD154抗体は、血小板凝集を亢進させたことが示される。陽性対照および陰性対照を用いたこのアッセイ法の結果から、血小板凝集に対する本発明の抗体の相対的影響を比較するためにこのアッセイ法を使用できることが実証される。

【0384】

血小板がその表面でCD154を発現するかを判定するために、血小板をビオチン結合抗CD154抗体と共にインキュベートし、結合されたビオチン化抗CD40L抗体を定量することによって、表面CD154の存在を判定することができる。したがって、CD154の表面発現は、10 μ M ADPと共にまたは10 μ M ADP無しで1分、10分、20分、40分、および60分間インキュベーションした後に評価した。CD40Lの表面発現は、活性化後早ければ1分で、ADPで活性化した血小板において検出可能であり、時間と共に増加した。ビオチン結合抗CD154抗体をsCD154と共にプレインキュベーションすると、活性化された血小板への結合が阻害されたため、ビオチン結合抗CD154抗体の結合はCD154に対して特異的である。また、不活性化(「休止中の」)血小板上で検出される表面CD154の量も、時間と共に増加した。この現象は、実験条件下での血小板活性化の基礎レベルに起因する可能性が高い。

【0385】

実施例12：アグリコシル化抗体および他の変種抗体の、変化したエフェクター機能を決定するための方法

以下の実施例は、本発明のアグリコシル化抗体および他の修飾された変種抗体のエフェクター機能を決定および特徴付けするために有用なアッセイ法を説明する。

【0386】

本発明のアグリコシル化抗体および他の修飾された変種抗体のエフェクター機能は、抗原に結合する、およびまたFcレセプターもしくはC1qのような補体分子に結合する抗体の能力に基づいて特徴付けすることができる。特に、Fc R結合親和性は、抗体がCD154抗原とFcレセプターを有する細胞の間に「架橋」を形成する能力に基づくアッセイ法を用いて測定することができる。C1q結合親和性は、抗体がCD154抗原とC1qの間に「架橋」を形成する能力に基づいて測定することができる。本発明の抗体とFcRまたは補体との相互作用はまた、ビーズに基づいたAlphaScreen(登録商標)技術(Perkin Elmer(登録商標))を用いて測定することもできる。

【0387】

Fcレセプター結合アッセイ法

Fc R架橋アッセイ法は、96ウェルMaxisorb ELISAプレート(Nalge-Nunc Rochester, NY, USA)を組換え可溶性ヒトCD154リガンドで(例えば、4 で一晚、PBS中、1 μ g/mlの濃度で;Karpusas et al. 1995 Structure 3(10):1031-1039および3(12):1426ならびにKarpusas et al. 2001 Structure 9(4):321-329)コーティングすることによって実施することができる。抗CD154抗体のグリコシル化型またはアグリコシル化型を滴下して(titrations)、37 で30分間、CD154に結合させ、次いでプレートを洗浄し、蛍光標識したU937(CD64+)細胞の結合を測定する。U937細胞は、10%FBS、10mM HEPES、L-グルタミン、およびペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI培地中で増殖させ、1:2に分割し、かつ、1000ユニット/mlのIFN を用いたアッセイ法の前に1日活性化して、Fcレセプター(Fc RI)発現を増大させてよい。

【0388】

このアッセイ法の別の変形例において、本発明の抗体がFc RIII(CD16)のようなさらに別のFcレセプターに結合するか、またはむしろ結合できない能力は、CD16発現構築物を用いてトランスフェクトした蛍光標識ヒトT細胞(ジャーカット細胞)に対して上記の架橋アッセイ法を用いることによって、発揮させることができる。96ウェル組織培養プレート(Corning Life Sciences Acton, MA, USA)中で増殖させた、CD154を発現するヤニーズラムスター卵巣(CHO)細胞の単層によってリガンドを産生させることができる。例えば、CHO-CD154+細胞を1 \times 10⁵細胞/mlの密度で96ウェルプレート中に播種し、10%透析FBS、100nMメトトレキサート、L-グルタミン、およびペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco-BRL Rockville, MD, USA)を含むoc-MEM中でコンフルエントになるまで増殖させる。CD16+ジャー

カット細胞を、10%FBS、400pg/mlのジェネテシン、10mM HEPES、ピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、およびペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco-BRL)を含むRPMI中で増殖させ、アッセイ法を実施する1日前に1:2に分割する。

【0389】

両方のレセプターに対するアッセイ法において、Fcレセプターを有する細胞は、37℃で20分間、2',7'-ビス-(2-カルボキシエチル)-5-(および-6)-カルボキシフルオレセインアセトキシメチルエステル(BCECF-AM)(Molecular Probes Eugene, OR, USA)で標識してよい。過剰な標識を除去するために洗浄した後、 1×10^5 個の標識した細胞を37℃で30分間、アッセイ法においてインキュベートする。数回洗浄することによって未結合のFc R陽性細胞を除去し、マイクロプレートリーダー(Cytofluor 2350 Fluorescent Microplate Reader, Millipore Corporation Bedford, MA, USA)によって励起波長485nmおよび発光波長530nmでプレートを読み取る。

10

【0390】

前述のアッセイ法のほかに、Fcレセプターへの本発明の抗体の結合は、AlphaScreen(商標)(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay(増幅ルミネセンス近接ホモジニアスアッセイ法);Perkin Elmer)を用いて競合形式で、または表面プラズモン共鳴(Biacore(登録商標))を用いて直接的に測定することができる。Biacoreアッセイ法では、Biacore(登録商標)3000機器を用いて、プロテインA/Gチップ上に捕捉された抗体への分析物レセプターの結合をモニターすることができる。Biacore(登録商標)は、タンパク質同士の相互作用を特徴付けるための十分に確立した方法であり(Myszka 1997 Curr Opin Biotechnol. 8:50-57.; MalmbergおよびBorrebaeck 1995 J Immunol Methods 183:7-13)、Fc RI IIへのIgG抗体の結合を測定するために成功裡に使用されている(Galon et al., 1997 Eur J Immunol.27:1928-1932)。例えば、プロテインA/Gをセンサーチップ(例えば、NHS化学反応を用いるCM5センサーチップ)に共有結合させる。泳動用緩衝液(例えば、HBS-EP(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005%(v/v)Surfactant P20、Biacore(登録商標))、およびチップ再生緩衝液(例えば、Glycine 1.5(10mMグリシン-HCl、pH1.5、Biacore(登録商標))をアッセイ法において使用する。低いエフェクター機能を有する変種抗CD154抗体および野生型抗CD154抗体または天然抗CD154抗体を泳動用緩衝液(例えばHBS-EP緩衝液)中で100nMまで希釈し、プロテインA/Gチップに5分間結合させる。一連の濃度のレセプターを結合段階で結合させた後に、緩衝液を用いた解離段階を続けた。抗体を含まないサイクルは、ベースラインの応答を与える。センサーグラムを1:1ラングミュア(Langmuir)結合モデルに全体的にフィットさせて、例えば、BIA評価ソフトウェア バージョン4.1(Biacore(登録商標))を用いて、平衡解離定数(K_D)を得ることができる。

20

30

【0391】

Alpha Screenアッセイ法では、ストレプトアビジンドナービーズに結合されたビオチン化IgGと抗GSTアクセプタービーズに結合されたFc R-His-GSTとの相互作用に競合するタグ無し抗体を使用する。野生型抗CD154抗体または天然抗CD154抗体(IgG1抗体など)を標準的な方法を用いてビオチン化し、PBS中で希釈する。抗GSTアクセプタービーズおよびストレプトアビジンドナービーズは、商業的供給業者から入手可能であり、最終濃度20 μ g/mlで使用することができる。1 \times アッセイ用緩衝液(例えば、25mM HEPES、100mM NaCl、0.1% BSA、0.01% Tween-20、pH7.4)に溶かしたFc RI-His-GST、Fc RI IIa-His-GST、Fc RI IIa-His-GST、または他の任意のタグ化FcRを、96ウェルプレートの各ウェル中に最終濃度が0.5nMになるように分配する。野生型抗CD154抗体もしくは天然抗CD154抗体、変種抗CD154抗体、または緩衝液は、1 \times アッセイ用緩衝液中の1/2 log希釈物として調製し、各ウェルに直接等分する。短時間遠心分離した後、1 \times アッセイ用緩衝液に溶かしたビオチン化野生型抗CD154抗体(例えばIgG1抗体)を最終濃度が5nMになるように各ウェルに添加する。100 μ g/mlの抗GSTアクセプタービーズを各ウェルに添加し、室温で1時間、暗所でプレートをインキュベートする。100 μ g/mlのストレプトアビジンドナービーズを各プレートに添加し、短時間遠心分離した後、室温で1.5時間、プレートをインキュベートする。反応試料を白色不透明プレートに移し、Fusion(商標)Alpha- FP HTマイクロプレートリーダー

40

50

(Perkin Elmer)で蛍光を読み取る。最も高いシグナル(競合無し)に対してデータを標準化し、例えば、GraphPad Prismソフトウェア(GraphPad Software)による非線形回帰を用いて、1部位競合モデルにフィットさせることができる。

【0392】

当業者は、上記または同様のアッセイ法を実施して、例えばFc R11aを含む任意のFcRに対する抗体変種の結合を測定することができる。

【0393】

C1q結合アッセイ法

C1q結合アッセイ法は、PBS中、4 で一晩、10 µg/mlの組換え可溶性ヒトCD154リガンド(Karpusas et al. Structure, 15;3 (12):1426 (1995))50 µlで96ウェルMaxisorb ELISAプレート(Nalge-Nunc Rochester, NY, USA)をコーティングすることによって実施することができる。これらのウェルを吸引し、洗浄緩衝液(PBS、0.05% Tween20)で3回洗浄し、200 µl/ウェルのブロッキング/希釈緩衝液(0.1M Na₂HPO₄、pH7.0、1M NaCl、0.05% Tween20、0.1%ゼラチン)で少なくとも1時間ブロッキングする。試験する抗体をブロッキング/希釈緩衝液中で希釈する(15 µg/mlから始めて、3倍希釈する)。1つのウェルにつき50 µlを添加し、室温で2時間、プレートをインキュベートする。

【0394】

前述したように吸引し、洗浄した後、ブロッキング/希釈緩衝液中で希釈した2 µg/mlのSigma社製ヒトC1q(C0660)をウェル当たり50 µl添加し、室温で1.5時間、インキュベートする。前述したように吸引し、洗浄した後、ブロッキング/希釈緩衝液中で3,560倍に希釈したヒツジ抗C1q(Serotec AHP033)をウェル当たり50 µl添加する。室温で1時間インキュベーションした後、前述したようにウェルを吸引し、洗浄する。次いで、ブロッキング/希釈液中で1:10,000に希釈したロバ抗ヒツジIgG HRP結合体(Jackson ImmunoResearch 713-035-147)をウェル当たり50 µl添加し、これらのウェルを室温で1時間インキュベートする。

【0395】

前述したように吸引し、洗浄した後、TMB基質(0.1M酢酸ナトリウム/クエン酸緩衝液、pH 4.9に溶かした420 µM TMB、0.004% H₂O₂)100 µlを添加し、2分間インキュベートした後、2N硫酸100 µlで反応を停止させる。Softmax PRO機器を用いて450nmでの吸光度を読み取り、Softmaxソフトウェアを使用して、4パラメーターフィットによって相対的結合親和性(C値)を決定する。

【0396】

代替のC1q結合アッセイ法では、C1qへの抗CD154結合を判定するためにELISAを使用するが、架橋としてCD154を使用しない。手短かに言えば、コーティング緩衝液に溶かした変種抗体または親抗体(対照)で、4 で一晩、アッセイ用プレートをコーティングしてよい。次いで、プレートを洗浄し、ブロッキングしてよい。洗浄後、一定分量のヒトC1qを各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートしてよい。さらに洗浄した後、ヒツジ抗補体C1qペルオキシダーゼ結合抗体100 µlを各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートしてよい。洗浄緩衝液でプレートを再び洗浄してよく、かつ、OPD(0-phenylenediamine dihydrochloride(Sigma))を含む基質緩衝液100 µlを各ウェルに添加してよい。黄色の出現によって観察される酸化反応を30分間進行させ、4.5N H₂SO₄を100 µl添加して停止させてよい。次いで、吸光度を(492~405)nmで読み取ってよい。

【0397】

例示的な抗体変種は、このアッセイ法で「C1q結合の有意な減少」を示すものである。いくつかの態様において、有意な減少とは、変異していないIgG1 Fc領域を有する100 µg/mlの対照抗体と比べて、約50分の1またはそれ以下にC1q結合が減少することを示す約100 µg/mlの抗体変種でよい。最も好ましい態様において、ポリペプチド(すなわち抗体)変種はC1qに結合しない。すなわち、100 µg/mlの抗体変種は、100 µg/mlの対照抗体と比べて、約100分の1またはそれ以下にC1q結合が減少することを示す。

【0398】

10

20

30

40

50

補体活性化およびCDC

補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に説明されているようにして、補体依存性細胞障害(CDC)アッセイ法を実施してよい。手短かに言えば、様々な濃度のポリペプチド(すなわち抗体)変種およびヒト補体を緩衝液で希釈してよい。ポリペプチド変種が結合する抗原を発現する細胞を、約 1×10^6 細胞/mlの濃度まで希釈してよい。ポリペプチド変種、希釈したヒト補体、および抗原を発現する細胞の混合物を平底組織培養96ウェルプレートに添加し、37 °Cおよび5%CO₂で2時間インキュベートさせて、補体媒介の細胞溶解を促進することができる。次いで、アラマブルー(Accumed International)50 μlを各ウェルに添加し、37 °Cで一晩インキュベートしてよい。530nmでの励起および590nmでの発光を用いて、96ウェル蛍光光度計によって吸光度を測定する。これらの結果は、相対蛍光単位(RFU)で表すことができる。試料濃度は、検量線からコンピューターで計算することができ、非変種ポリペプチドと比べた活性率(%)を、関心対象のポリペプチド変種に関して報告する。

【0399】

実施例13：CD154タンパク質上の342抗体結合部位のマッピング

実験を実施して、ヒト-マウスのキメラCD154タンパク質を用いて、342の結合において重要であるヒトCD154中のアミノ酸残基を同定した。342はヒトCD154に高い親和力で結合するが、マウスCD154には結合しない。したがって、CD154マウス残基を対応するヒト残基のものに変異させ、かつ342に対する変異タンパク質の親和性の変化を測定することによって、重要な結合残基を同定することができる。選択した領域のヒト残基を可溶性マウスCD154に導入した(図28中で印をつけた1~6)変異体の6つのグループを選択した。ヒトおよびマウスの変異していない可溶性CD154(sCD154)タンパク質もまた、評価した。チップ上に固定した342(IgG型)および溶液相のsCD154上清を用いたBiacore(登録商標)実験で、様々なsCD154タンパク質を使用した。これらの結果から、マウスCD154中にヒトのグループ5の残基を導入した場合にだけ342結合が起こることが実証された。

【0400】

実施例14：競合ELISA交差ブロッキングアッセイ法

342Fab'および5c8Fab'の交差ブロッキングを実証するために、本発明者らは競合ELISAを使用した。このアッセイ法において、抗Myc抗体9E10をELISAプレートに塗った。Mycタグ化CD154をこの抗体によって捕捉した。非標識の342Fab'または5c8Fab'の希釈系列を、PBS、0.05%Tween-20、1%BSAを含むプレートにおいて、室温で2時間、1nMビオチン342Fab'または0.3nMビオチン5c8のいずれかと共にインキュベートした。プレートを洗浄し、結合されたビオチン化5c8Fab'の量を、二次反応物としてストレプトアビジンHRPを用いて決定した。シグナルをグラフ化し、Prismソフトウェア(Graph Pad)の1部位結合双曲線フィットまたは2部位結合双曲線フィットのいずれかを用いてフィットさせた。

【0401】

交差ブロッキング解析に適切な濃度を決定するためにCD154に対してビオチン342Fab'の滴定を実施した(図29A)。1nMの濃度が曲線の直線部分に相当することが判明した。また、交差ブロッキング解析に適切な濃度を決定するためにCD154に対してビオチン5c8Fab'の滴定も実施した(図29B)。0.3nMの濃度が曲線の直線部分に相当することが判明した。非標識342Fab'によってビオチン342Fab'およびビオチン5c8Fab'の交差ブロッキングを解析する実験において、342Fab'は、0.09nMの親和力でビオチン342Fab'結合を阻害した(図29C)。342Fab'は、2つの結合親和力、すなわち0.134nMおよび76nMでビオチン5c8結合を阻害する(図29C)。非標識5c8Fab'によるビオチン342の交差ブロッキングを図29Dに示す。この曲線上の5c8Fab'の最大濃度は50nMであり、5c8の飽和点を十分に上回り、また、ビオチン342の濃度1nMも十分に上回っている。これらの濃度では完全な阻害が無いことから、5c8は、CD40L上の342結合部位のすべてを完全にブロックできないことが示唆される。

【図1】

抗CD154抗体342のCDR配列

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 3	CDR-H1	GFSSSTNYHVVH
SEQ ID NO: 4	CDR-H2	VIWGDGDTSYNSVLKS
SEQ ID NO: 5	CDR-H3	QLTHYYVLAA
SEQ ID NO: 6	CDR-L1	RASEDLYYNLA
SEQ ID NO: 7	CDR-L2	DTYRLAD
SEQ ID NO: 8	CDR-L3	QYYKFPFT

抗CD154抗体381のCDR配列

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 42	CDR-H1	GTFSDYYMA
SEQ ID NO: 43	CDR-H2	SISYEGSSYYGDSVKG
SEQ ID NO: 44	CDR-H3	HDDSPGYFFDY
SEQ ID NO: 45	CDR-L1	LAGEDISNLA
SEQ ID NO: 46	CDR-L2	AANRLQD
SEQ ID NO: 47	CDR-L3	QQTFRYPLT

抗CD154抗体338のCDR配列

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 48	CDR-H1	GFSLTSHHIS
SEQ ID NO: 49	CDR-H2	VMLWDDGGTLYNSALKS
SEQ ID NO: 50	CDR-H3	GKMHHYYLDA
SEQ ID NO: 51	CDR-L1	RTSEDIYSNLA
SEQ ID NO: 52	CDR-L2	DTNRLAD
SEQ ID NO: 53	CDR-L3	QHYSNFPWT

【図2】

ラット抗CD154抗体342の配列

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 29 (図9の重鎖342)	RAT 342 Ab VH 領域	QVQLKESGPGLVQPSETLSLTCTVSGFSSSTNYHVVHWRQPPGKSLW MGVIWGDGDTSYNSVLKSRLSITRDRSRQVFLKMSLSLQEDTATYY CARQLTHYYVLAAWGGASVTVS
SEQ ID NO: 34	シグナル配列をもつ、ラット342Ab VH領域	atggctgtcctgggtgctgtctgctgctgctgacattccaagctg tgtctcctgccagctgagctgagagagctcagcagctggctggctgc agccctcagagaccctgctctcactgcaactgctctctgggttctca tcaaccaatcatctgcaactgggtcgacagcctccaggaaaaag tcttgagtgatggagtaaatggggtgatggagacacatcatata attcagttctcaaatcccgactgacatcaccagggacaccccgag agccaagtcttcttaaaatgagcagctgcaaacggaggaactgc cactcactatgtgccaggcaatgactcatcactatgtctcgctg cctgggtcaaggagctcagctcactgctcg
SEQ ID NO: 32	シグナル配列をもたない、ラット342Ab VH領域	caggtgcagctgaaggagctcagcactggcctggctgagccctcaga gaccctgctctcactgcaactgctctgggtctctcactcaaccaat atcctgctgcaactgggtcgacagcctccaggaaaaagtctgagtg atgggagtaaatggggtgatggagacaacatcatataaattcagtt caaatcccgactgacatcaccagggacacccagagccaagtct tcttaaaatgagcagctgcaaacggaggaactgcaactcactat tgtgccaggcaatgactcatcactatgtctggctgctgggtgca aggagctcagctcactgctcg
SEQ ID NO: 30 (図9の軽鎖342)	RAT 342 Ab VL 領域	DIQMTQSPASLSASLGTETVTCRASEDLYYNLAWYQRKFGNSPQLL IYDTRLDGVPFRFSGSSGDTYSLKINTLPSGDVASYFCQQYK PFTFGSGTKLELK
SEQ ID NO: 33	シグナル配列をもつ、ラット342Ab VL領域	atgggtgctgcccactcatctcctgggtgtgtgctactgtgattac agatgcatatgtgacatccagatgacacagctccagcttccctg ctgactctggggaactcctcctgcaatgctgagcaagagga gaccttactataatttggctggtatcagcggaacccaggaactc tctcactcctgctgctatgacacatagggtggagatgggtcc catcaggttctgagggcagtggtctggcaacagcttctcctaaag ataaacaccctgccactggagatgctcgaagtatttctgtcaaca gtattcaaaatttccctcactcctggctcagggaaccaagctggaac tgaaa
SEQ ID NO: 31	シグナル配列をもたない、ラット342Ab VL領域	gacatccagatgacacagctcctcagcttccctgctgcaactctggg gaaactgtcagctgcaatgctgagcaagctgaggaacttactata atttgcagtggtatcagcggaacccaggaactcctcactcctg atctatgacacatagggtggagatgggtcccactcagctcag tggcagtggtctggcaacagcttctcctaaagataaacaccctgc cactcggagatgctcgaagtatttctgccaagatatacaaaatt ccattcagcttggctcagggaaccaagctggaactgaaa

【図3】

アクセターフレームワーク配列

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 35 (図9の211012)	ヒトVK1 2-1-(1) 012 JK1アクセターフレームワーク	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQSISSYLNWYQOK PGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFRSGSGDTFTLTISSL QPEDFATYYCQSYSTPWTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 36	ヒトVK1 2-1-(1) 012 JK1アクセターフレームワーク	gacatccagatgaccagctcctcactcctcctgct tgcactctgtaggagacagagctcaccatcacttgc gggcaagtccagagcattagcagctatttaaatgg tatcagcagaaccagggaagcccttaagctcct gatctatgctgcaactcctgcaaaagtgggtcc catcaaggttcagtgagcagtgatctgggacagat ttctgcaacttactactgcaacagagttacagta cccttgagcgttcggccaagggaacaggtggaa atcaaa
SEQ ID NO: 37 (図9の1-13-66)	ヒトVH3 1-1 3-66 JH4アクセターフレームワーク	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQ APGKLEWVSVIYSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMSLRADTAVYYCARYFDYWGQGLTVTVS
SEQ ID NO: 38	ヒトVH3 1-1 3-66 JH4アクセターフレームワーク	gaggtgcagctgggtgagctctggggaggccttgg cagcctgggggtccctgagactcctctgtcag cctctggattcaccctcagtagcaactacatgagc tgggtccgcccagctccaggaaggcctggagtg ggtctcagttatttatagcgtgtagcaactact acgcagactcctggaaggcagattcaccatctcc agagacaattccaagaacacagctgattctcaaat gaacagcctgagagcggagacacggctgtgatt actgtgcagatacttgaactactggggcaggga accctggctcagctctcc
SEQ ID NO: 39 (図9の1-14-59)	ヒトVH4 1-1 4-59 JH4アクセターフレームワーク	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ PPGKLEWIGIYYSGSTNYNFSLSKRVITISVDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCARYFDYWGQGLTVTVS
SEQ ID NO: 40	ヒトVH4 1-1 4-59 JH4アクセターフレームワーク	caggtgcagctgagagctcgggcccaggactgg gaagcctcgggagaccctgtccctcactgcaactg tctctgggtgctccctcagtagtactactggagc tggatccggcagccccagggaaggactggagtg gattgggtatactctattacagtgaggagcaccact acaaccctcctcaagagctcagctcaccatata ctagacaactcgaagaacagcttccctgagct gagctctgtaccgctcgggacacggcctgtatt actgtgcagatacttgaactactggggcaggga accctggctcagctctcc

【図4】

アクセターフレームワークをベースとする342CDRグラフト

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 10 (図9のVH3 #17)	VH3 1-1 3-66 JH4アクセターフレームワークをベースとする、可変重鎖CDRのみのグラフト	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYHVVHWRQ PGKLEWVSVIWGDGDTSYNSVLKSRFTISRDNKNTL YLMNSLRADTAVYYCARQLTHYYVLAAWGGTLTVTS
SEQ ID NO: 20	VH3 1-1 3-66 JH4アクセターフレームワークをベースとする、可変重鎖CDRのみのグラフト	gaggtgcagctggctgagctcggaggcggcttgc cagctctgagggagcctggctctctctgctgagcagcggct cagctctcaactatcactgctgcaactgggtgctcagcga cctgggaaggcctggagtggtgagtgatttggggcg acggcagatcactcactcaactcctgctgagagcggctt caccatttccctgacaactcaagaatcctcttaccct cagatgaactctcctggcagaggaacacagcagctctat actgtgcagcagcaactgaccactatcagtttggcagc ctgggtcaagggaactcggctcagctctcg
SEQ ID NO: 9	VH4 1-1 4-59 JH4アクセターフレームワークをベースとする、可変重鎖CDRのみのグラフト	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSSSTNYHVVHWRQ RPPGKLEWIGIYVWGDGDTSYNSVLKSRVITISVDTS KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARQLTHYYVLAAWGG TLTVTS
SEQ ID NO: 19	VH4 1-1 4-59 JH4アクセターフレームワークをベースとする、可変重鎖CDRのみのグラフト	caggtgcagctgagagctcggaccggggcttgc agcctagttagaccctgagcctcacttgtaccgtgag cggctcagctcactcaactatcactgctgcaactggat cgtcagcactcgggaaggcctggagtgattgggt ttatttggggcagcggcagatcctcactcaactcctg cctgaagcggctgtcacttccctgtagcactca aagaatcaatttccctcaagtgagctgtgctcagc cagcggcagcagcagctctactgtgcaactcaact gaccactatagctttggcagcctgggtcaagg actcgtgctcagctctcg
SEQ ID NO: 14 (図9のVK1 #13)	VK1 2-1-(1) 012 JK1アクセターフレームワークをベースとする、可変軽鎖CDRのみのグラフト	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASEDLYYNLAWYQ KPKAPKLLIYDTRLDGVPFRFSGSGDTFTLTISSL QPEDFATYYCQYYKFPFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 16	VK1 2-1-(1) 012 JK1アクセターフレームワークをベースとする、可変軽鎖CDRのみのグラフト	gatatccagatgaccagagctccaagcagctctc ccagcagctaggcagctcgtgtgactatcactgctg cagtgaggacctctatacaactggcctggatcag caaaaaccggcctcaagccccgaagctcactcatg atagctaccgctggctgagcgggtgccaagcggctt cagtgaggcaggcagcggctactgacttaccctca atctcgtctcctcagcgggaagtctcagcacttact atgtgcagaaatatacaagttcccttcccttggc tcaggcactaaagtagaatacaaa

【 図 5 】

アクセプターフレームワークをベースとする342 gH1

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 1 (図9のVH3 gH1)	VH3 1-1 3-66 JH4 アクセプターフレーム ワークをベースとするgH1	EVQLVDSGGGLVPGGSLRLSCAVSGFSSSTNYHV HWVRQAPGKLEWVGVIWGDGDTSYNSVLKSRFT ISRDTSKNTVYVLMNSLRAEDTAVVYCARQLTHY YVLAANGQGLTVTVS
SEQ ID NO: 22	VH3 1-1 3-66 JH4 アクセプターフレーム ワークをベースとするgH1	gaggtgcagctggctcgagctctggagcgggcttgc agcctggggagcctgcgctctctctgtgcagtgag cggtctcagctctaccaattaccatgtgcaactgggtg cgctcaggcactcgggaaggcctggagtggatgggtg ttatttggggcgagcggcgatcaactcctacaactccgt cctgaagagcggcttccaccatttcccgtagacacccca aagaaatccgtttaccctccagatgaactctctccgg cagaggacacagcagctctactctgcaagcctcaact gaccactattacgttttggcagcctggggcgaaggg actctggctcagagctctcg
SEQ ID NO: 11 (図9のVH4 gH1)	VH4 1-1 4-59 JH4 アクセプターフレーム ワークをベースとするgH1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGFSSSTNYHV HWIRQPPGKLEWVGVIWGDGDTSYNSVLKSRVT ISRDTSKNQVSLKLSVTAADTAVVYCARQLTHY YVLAANGQGLTVTVS
SEQ ID NO: 21	VH4 1-1 4-59 JH4 アクセプターフレーム ワークをベースとするgH1	caggtgcagctgcaggagctctggaccggggcttg tcaagcctagtgcagcctgcagcctcactgtgtac cgtgagcggctcagctctaccaattaccatgtg cactggatctcgtcagccactcgggaaggcctgg agtggatgggtgttatttggggcgagcggcgatca atcctacaactccgctcctgaagagcggctgtcacc atttcccgtagacacctcaagaatcaagtttccc tcaagttgagctctgtcaccgcagcggcaacagc agctctactgtgcaagcctcaactgaccactat tacgtttggcagcctgggtcgaagggactctg tcacagctctcg

【 図 6 】

342 gL4

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 2 (図9のVK1 gL4)	gL4 可変領域	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDLVYNLA WYQRKPKGKPKLLIYDITYRLADGVPSRFSGSGG TDYTLTISLQPEDFASYYCQQYKFPPTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 17	gL4 可変領域	gatatacagatgaccagagctccaagcagctctct ccgccagcgtgagcagctctgtgactattaccctg tcgctcagctgagcagctcttatacaactcggcc tcggtatcagcgtcaaacccggcaaacccccaagc tgctcatctatgatacctaccgctggctgacgg tgtgccaagcggcttccagtgagcgtggcagcgg actgactataccctcaacaatttctgctctccagc cggaaagtctccctctactattgtcagcaata ttcaagctccctttcactctcggctcagggcact aaagtagaatacaaa
SEQ ID NO: 25	下線を施した シグナルペプチドを コードする配列をもつ gL4可変領域配列	atgaaaaagcagctatcgcaattgcagtgccct tggcctggcttccgctaccgtagcgcagctgatat ccagatgaccagagctccaagcagctctccgcc agcgtaggcagctcgtgactataccctgctg ccagtgaggactctattcaaacctggcctgcta tcagcgtaacccggcaaacccccaagcgtgctc atctatgatacctaccgctggctgacgggtgtgc caagcggcttccagtgagcagtgccagggactga ctataccctcaacaatttctgctctccagcggaa gatttccgctctactattgtcagcaataatca agttccctttccactctcggctcagggcactaaagt agaaatcaaa

【 図 7 - 1 】

342 配列

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 15	342gL4軽鎖 (定常領域を含む)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDLVYNLA WYQRKPKGKPKLLIYDITYRLADGVPSRFSGSGG TDYTLTISLQPEDFASYYCQQYKFPPTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 18	342gL4軽鎖 (定常領域を含む)	atgaaaaagcagctatcgcaattgcagtgccct tggcctggcttccgctaccgtagcgcagctgatata ccagatgaccagagctctcctccgagcagctcgtg actataccctgctcgtcagcagctcctatacaacc tggcctggatcagcgttaaacccggcaaaccccca ggcctgctcatgatagctaccgctggctgagcgtg gccaagcggcttccagtgagcagtgagcagctat accctcaaatctcgtctcctccagcggcaagatt cgcctctatacttgcagcaatatacaagttccct tccactcggctcagggcactaaagtagaatacaac gtagcagcggcccatctgtctcctcctcccgccat ctgatgagcagctgaaatcctggaaactcctctg tctgctgctgcaataactctccagagagggcaca aagtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc agcgtgagcaaaagcagcagcagcagcagcagcag cctgagcaagtagcagcagcagcagcagcagcagc aaaaagtttaataagagggagtg
SEQ ID NO: 12	342gH1 Fab (ヒンジ無し)重鎖 (定常領域を含む)	EVQLVDSGGGLVPGGSLRLSCAVSGFSSSTNYHV HWVRQAPGKLEWVGVIWGDGDTSYNSVLKSRFT ISRDTSKNTVYVLMNSLRAEDTAVVYCARQLTHY YVLAANGQGLTVTVS

【 図 7 - 2 】

配列番号	説明	配列
SEQ ID NO: 26 (シグナル配列を もたないSEQ ID NO: 23)	342gH1 Fab (ヒンジ無し)重鎖 (定常領域を含む)	atgaaagagcagctatcgcaattgcagtgccct tggcctggcttccgctaccgtagcgcagctgatata ccagatgaccagagctctcctccgagcagctcgtg actataccctgctcgtcagcagctcctatacaacc tggcctggatcagcgttaaacccggcaaaccccca ggcctgctcatgatagctaccgctggctgagcgtg gccaagcggcttccagtgagcagtgagcagctat accctcaaatctcgtctcctccagcggcaagatt cgcctctatacttgcagcaatatacaagttccct tccactcggctcagggcactaaagtagaatacaac gtagcagcggcccatctgtctcctcctcccgccat ctgatgagcagctgaaatcctggaaactcctctg tctgctgctgcaataactctccagagagggcaca aagtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc agcgtgagcaaaagcagcagcagcagcagcagcag cctgagcaagtagcagcagcagcagcagcagcagc aaaaagtttaataagagggagtg
SEQ ID NO: 13	342gH1 Fab' 重鎖 (定常領域を含む)	EVQLVDSGGGLVPGGSLRLSCAVSGFSSSTNYHV HWVRQAPGKLEWVGVIWGDGDTSYNSVLKSRFT ISRDTSKNTVYVLMNSLRAEDTAVVYCARQLTHY YVLAANGQGLTVTVS
SEQ ID NO: 27 (シグナル配列を もたないSEQ ID NO: 24)	342gH1 Fab' 重鎖 (定常領域を含む)	atgaaagagcagctatcgcaattgcagtgccct tggcctggcttccgctaccgtagcgcagctgatata ccagatgaccagagctctcctccgagcagctcgtg actataccctgctcgtcagcagctcctatacaacc tggcctggatcagcgttaaacccggcaaaccccca ggcctgctcatgatagctaccgctggctgagcgtg gccaagcggcttccagtgagcagtgagcagctat accctcaaatctcgtctcctccagcggcaagatt cgcctctatacttgcagcaatatacaagttccct tccactcggctcagggcactaaagtagaatacaac gtagcagcggcccatctgtctcctcctcccgccat ctgatgagcagctgaaatcctggaaactcctctg tctgctgctgcaataactctccagagagggcaca aagtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc agcgtgagcaaaagcagcagcagcagcagcagcag cctgagcaagtagcagcagcagcagcagcagcagc aaaaagtttaataagagggagtg

【 図 8 - 1 】

SEQ ID NO: 28: 342gL4gH1 Fab (ヒンジ無し) ベクター-DNA配列

1 atgaaaaaga cagctatcgc aattgcaqtg gccttggctg gtttcgctac
51 cgtagcgcgaa gctGATATC agatgaccca gagtccaagc agtctctccg
101 ccagcgttagg cgatcgtgtg actattaccct gtcgtgccag tgaggacctc
151 tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa ccgggcaaaag ccccgaaagct
201 gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtcca agccgtttca
251 gtggcagtggt gacgcgtact gactataccc tcacaatttc gtcctccag
301 ccggaagatt tcgctcttta ctattgtcag caatattaca agttcccttt
351 caccttcggt caggccaact aagtagaagt caaaCGTACG gttagcgccc
401 catctgtctt catctcccg ccactctgat agcagtgtaa atctggaact
451 gcctctgttg tgtgctcgtc gaataacttc tatcccagag agggcaaaagt
501 acagtggagg gtggataaac ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg
551 tcacagagca ggacagcaag gacagcactc acagcctcag cagcaccctg
601 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctaac cctcgcaagt
651 caccatcag ggctcagctc caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg
701 agtgtaaaaa tgaagaagac tgctatagca attgcagtggt cgctagctgg
751 ttccgccacc gtggcgcaag ctgaggttCA GCTGgtcag tctggaggcg
801 ggcttgtcca gctgggtgg agcctgcgtc tctcttctgc agtgcgccc
851 ttcagctcta ccaattacca tgtgcaactg gtgcgtcagg cacctgggaa
901 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca
951 actcctcctc gaagagcctg ttaccatttt cccgtgacac ctcaaaagaat
1001 accgtttacc tcagatgaa ctctctccgc gcagaggaca cagcagctca
1051 ttactgtgac cgtcaactga ccactatta cgttttggca cctcgggctc
1101 aaggcactct ggtccacgtC TCAGGcgtt ctacaaaggg cccatcggct
1151 ttccccctcg cacctcctc ctgagagacc ctggtgggccc cagcggcctc
1201 gggctgctcg gtaaggactc acttccccga accggtgacg gttgctgga
1251 actcaggcgc cctgacagcg cagctgcaca ccttcccggc tgcctcaacg
1301 tctcaggagc tctactcctc ccgacagcgt gtgacagctg cctccagcag
1351 cttgggcacc cagactcaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
1401 ccaaggtcga caagaaagt ggagcccaat cttgttaa

【 図 8 - 2 】

SEQ ID NO: 41: 342gL4gH1 Fab' ベクター-DNA配列

1 atgaaaaaga cagctatcgc aattgcaqtg gccttggctg gtttcgctac
51 cgtagcgcgaa gctGATATC agatgaccca gagtccaagc agtctctccg
101 ccagcgttagg cgatcgtgtg actattaccct gtcgtgccag tgaggacctc
151 tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa ccgggcaaaag ccccgaaagct
201 gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtcca agccgtttca
251 gtggcagtggt gacgcgtact gactataccc tcacaatttc gtcctccag
301 ccggaagatt tcgctcttta ctattgtcag caatattaca agttcccttt
351 caccttcggt caggccaact aagtagaagt caaaCGTACG gttagcgccc
401 catctgtctt catctcccg ccactctgat agcagtgtaa atctggaact
451 gcctctgttg tgtgctcgtc gaataacttc tatcccagag agggcaaaagt
501 acagtggagg gtggataaac ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg
551 tcacagagca ggacagcaag gacagcactc acagcctcag cagcaccctg
601 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctaac cctcgcaagt
651 caccatcag ggctcagctc caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg
701 agtgtaaaaa tgaagaagac tgctatagca attgcagtggt cgctagctgg
751 ttccgccacc gtggcgcaag ctgaggttCA GCTGgtcag tctggaggcg
801 ggcttgtcca gctgggtgg agcctgcgtc tctcttctgc agtgcgccc
851 ttcagctcta ccaattacca tgtgcaactg gtgcgtcagg cacctgggaa
901 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca
951 actcctcctc gaagagcctg ttaccatttt cccgtgacac ctcaaaagaat
1001 accgtttacc tcagatgaa ctctctccgc gcagaggaca cagcagctca
1051 ttactgtgac cgtcaactga ccactatta cgttttggca cctcgggctc
1101 aaggcactct ggtccacgtC TCAGGcgtt ctacaaaggg cccatcggct
1151 ttccccctcg cacctcctc ctgagagacc ctggtgggccc cagcggcctc
1201 gggctgctcg gtaaggactc acttccccga accggtgacg gttgctgga
1251 actcaggcgc cctgacagcg cagctgcaca ccttcccggc tgcctcaacg
1301 tctcaggagc tctactcctc ccgacagcgt gtgacagctg cctccagcag
1351 cttgggcacc cagactcaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
1401 ccaaggtcga caagaaagt gagcccaaat cttgtgaca aactcacaca
1451 tgcgcccg

【 図 9 】

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
D1QWTPSASASASGSRVTVKASBEDDQKAKVQKPKNSKQLLI DDTYELADCPFRSFGSGSCVSKNTLPRGMSYFCQCYFFPTFGCKLEK
2 1 012 D1QWTPSASASGSRVTVKASBEDDQKAKVQKPKNSKQLLIYAASLQSGVPSRFSFGSGSDTDFLITSSLQPEDPATYVCOQSYFFPTFGCKVLEK
VK1 gI3 D1QWTPSASASGSRVTVKASBEDDQKAKVQKPKNSKQLLIYDTRVLAQDVPFRSFGSGSDTDFLITSSLQPEDPATYVCOQSYFFPTFGCKVLEK
VK1 gI4 D1QWTPSASASGSRVTVKASBEDDQKAKVQKPKNSKQLLIYDTRVLAQDVPFRSFGSGSDTDFLITSSLQPEDPATYVCOQSYFFPTFGCKVLEK
重組シフト342
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
QVQLKESGGLVQPGSLRLSRISGDSSTISLTCVSGFSTETNYHWVQPPKGLKLEWVYVWGDDSDTYSYSLKSRITISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS
重組342
1-1-3-66 EVQLVESGGGLVQPGSLRLSRISGDSSTISLTCVSGFSTETNYHWVQPPKGLKLEWVYVWGDDSDTYSYSLKSRITISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS
VK3 gH7 EVQLVESGGGLVQPGSLRLSRISGDSSTISLTCVSGFSTETNYHWVQPPKGLKLEWVYVWGDDSDTYSYSLKSRITISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS
VK3 gH1 EVQLVESGGGLVQPGSLRLSRISGDSSTISLTCVSGFSTETNYHWVQPPKGLKLEWVYVWGDDSDTYSYSLKSRITISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS
重組シフト342
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
QVQLKESGGLVQPGSLRLSRISGDSSTISLTCVSGFSTETNYHWVQPPKGLKLEWVYVWGDDSDTYSYSLKSRITISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS
重組342
1-1-4-59 EVQLKESGGLVQPGSLRLSRISGDSSTISLTCVSGFSTETNYHWVQPPKGLKLEWVYVWGDDSDTYSYSLKSRITISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS
VK4 gH6 EVQLKESGGLVQPGSLRLSRISGDSSTISLTCVSGFSTETNYHWVQPPKGLKLEWVYVWGDDSDTYSYSLKSRITISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS
VK4 gH1 EVQLKESGGLVQPGSLRLSRISGDSSTISLTCVSGFSTETNYHWVQPPKGLKLEWVYVWGDDSDTYSYSLKSRITISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS

【 図 10 】

抗CD154抗体381

V_L 配列

SEQ ID NO: 54 (下線を施した配列はCDR配列である)
DIQMTQSPTLSASLGLTQVSLTISVDTSKNSQSLKLSVTAADTAVYCARQLRHRYVYLAAGQGDTLVYS
ANRLQDGVPS RFSGSGSSTR YSLKISGMRP EDEADYFCQQ TFRYPLTPGS
GTKLELK

SEQ ID NO: 55
GACATCCAGA TGACACAGTC TCCAACCTCC CTGTCTGCAT CTCTCGGAGA
AACTGTCTCC ATCGAATGTC TAGCAGGTGA AGACATTTC AATGTTTAG
CGTGTGTATCA GCAGAAGTCA GGGGGTCTC CTCAGCTCTC GATCFATGCT
GCAAAATAGT TACAAGACGG GGTCCCCTCA CGTTCAGTG CAGTGGATC
TGCCACACGG TATTCTCTCA AGATCAGTGG CATGCACCT GAAGATGAA
CAGATTATT CTGTCAACAG ACTTTCAGGT ATCCGCTCAC GTTCGGTTCT
GGGACCAAGC TGAATTGAA A

V_H 配列

SEQ ID NO: 56 (下線を施した配列はCDR配列である)
EVPLVLSGGG LVQPPGRSMKL SCVASGFTFS DYYMAWVRQA PKKGLEWVAS
ISYEGSSTYY GDSVKGRFTV SRDIKASTLY LQMHSLKSED TAIYYCARHD
DSPGYFYDYW GQGVMTVVS

SEQ ID NO: 57
GAGGTGCCGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGCC TTAGTGCAGC CTGGAAGGTC
CATGAAACTT TCCTGTGTAG CCTCAGGATT CACTTTCAGT GACTATTACA
TGGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAAAGAAGG GTCTGGAGTG GGTCCGATCC
ATTGATTATG AGGGTAGTAG TACTTACTAT GGAGACTCCG TGAAGGGCCG
ATTCACTGTC TCCAGAGATA TTGCAAAGG CACCCTATAC CTTCAAATGC
ACAGTCTGAA GTCTGAGGAT ACGGCCATTT ATTATTGTGC ACGACATGAC
GATAGTCCAG GATACTACTT TGATTATTGG GGCCAAGGAC TCATGGTCAC
AGTCTCG

【 図 1 1 】

抗CD154抗体338

V_L 配列

SEQ ID NO: 58 (下線を施した配列はCDR配列である)
DIQMTQSPAS LSASLGFTVT IECRTSEDIY SNLAWYRQRP GKSPQLLIYD
TNRLLADGVPS RFGSGSGSTQ YSLKINSLSQ EDVASYFCQH YSNFPFWTFGG
DTKLELK

SEQ ID NO: 59
GACATCCAGA TGACACAGTC TCCGGCTTCC CTGTCTGCAT CTCTGGGAGA
AACTGTCAAC ATCGAATGTC GAACAAGTGA GGACATTTAC AGTAATTTAG
CGTGGTATCG GCAGAGACCA GGGAGTCTC CTCAGCTCCT GATCTATGAT
ACAAATAGAT TGGCTGATGG GGTCCCCTCA CGGTTCAGTG GCAGTGGATC
TGGCACACAA TATTCTCTAA AGATAAACAG CCTGCAATCT GAAGATGTCC
CCAGCTATTT CTGTCAACAC TATAGCAATT TTCGTGGAC CTTCGGTGGGA
GACACCAAGC TGGAAATTGAA A

V_H 配列

SEQ ID NO: 60 (下線を施した配列はCDR配列である)
QVQLTQSPGQ LVQPSQTLISL TCTVSGFSLT SHHISWVRPQ PGKGLEWVGV
MWNDDGTLIN SALKSRPIS RDTSKSKVFL KMSLQTEDT ATYYCARGKM
HYYVLDLAWGQ GASVTVS

SEQ ID NO: 61
CAGGTGCAGC TGACGGAGTC AGGGCCTGGC CTGGTGCAGC CCTCACAGAC
CCTGTCTCTC ACCTGCACCTG TCTCTGGGTT CTCATTAACC AGCCATCATA
TATCTCGGTT TCGACAGCCT CCAGGAAAG GTCTGGAGTG GGTGGGAGTC
ATGTGGAAATG ATGGAGGCAC ATTTATAAAT TCAGCTCTCA AGTCTCGACC
GAGCATCAGT AGGGACACCT CCAAGAGTCA GGTCTTCTTA AAAATGAGCA
GTCTGCAAC TGAAGACACA GCCACTTACT ACTGTGCCAG GGGCAAAATG
CATTACTATG TTCTGGATGC CTGGGGTCAA GGAGCTTACG TCACTGTCTC
G

【 図 1 3 】

hu5c8 κ 軽鎖

SEQ ID NO: 62 (下線を施した配列はシグナル配列である)
METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS
SSTYSYMHYV QQKPGQPPKL LIKYANLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS
SVEPEDFATY YQHSWEIIP TFGGTTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

SEQ ID NO: 63 (成熟タンパク質)
DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS SSTYSYMHYV QQKPGQPPKL
LIKYANLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SVEPEDFATY YQHSWEIIP
TFGGTTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

SEQ ID NO: 64 (オープンリーディングフレーム)
ATGGAGACAG ACACACTCCT GTTATGGGGT CTGCTGCTCT GGGTCCAGG
TTCCACTGGT GACATTGTAC TGACACAGTC TCCTGTACC TTATCTGTAT
TCCGGGAGA GAGGCCACC ATCTCATGCA GGGCCAGCCA ACGTGTCACT
TCATCTACCT ATAGTTATAT GCACTGGTAC CAACAGAAAC CAGACAGCC
ACCCAAACTC CTCATCAAGT ATGCATCCAA CCTAGAAATCT GGGTCCCTG
CCAGGTTACG TGGCAGTGGG TCTGGGACTG ACTTCACTCT CACCATCTCT
TCTGTGGAGC CGGAGGATTT TGCAACATAT TACTGTGAGC ACAGTTGGGA
GATTCTCTCG ACGTTCGGTG GAGGACCAA GCTGGAGATC AAACGAACTG
TGGTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
TCTGGAACCTG CCTCTGTGTG GTGCTGCTGT AATAACTTCT ATCCAGAGA
GGCCAAAGTA CAGTGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACTCCC
AGGAGACTGT CACAGACGAC CACAGCAAGS ACAGCACTA CAGCTCAGC
AGCACCTGTA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
TTCGGAAGTC ACCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTACA AAGAGCTTCA
ACAGGGGAGA GTGTTAG

【 図 1 2 】

抗ヒトCD154 (CD40L) 抗体
(キメラFab')

Table with 4 columns: 抗体, Kd Biacore (pM), CD40 結合 IC50 (ng/ml), ICAM-1 上方制御 IC50 (ng/ml). Rows include Hu5c8 (全Ig), CA081-00294 (294), CA081-00295 (295), CA081-00300 (300), CA081-00335 (335), CA081-00303 (303), CA081-00338 (338), CA081-00342 (342), CA081-00381 (381), CA081-00402 (402).

【 図 1 4 - 1 】

hu5c8 aglyP-huIgG4重鎖

SEQ ID NO: 65 (下線を施した配列はシグナル配列である)
MDWTWRVFCV LAVAPGAHQV VQLVQSGAEV VKPGASVKLS CKASGYIFTS
YYMYVVKQAP GQGLEWIGEI NPSNGDTNFN EKFKSKATLT VDKSASTAYM
ELSSLRSEDT AVYYCTRSDD RNDMDSWQGG TLVTVSSAST KGPSVFPPLAP
CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
SLSSVTVTPS SSLGTRKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVERSKYQ PPSVPCPAP
FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTEPVTCV VDVSDQEDPEV QPNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQFNASRYRV SVLTVLHQDW LNKGEYKCKV SNKGLPSSIE
KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
NQGPENNYKT TFPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVP SCSVMHEALH
NHYTQKLSL SLG

SEQ ID NO: 66 (成熟タンパク質: S228P/T299A変異に下線を施し、太字で示す)
QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYMYVVKQA PGQGLEWIGE
INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRSDD
GRNDMDSWQG GTLTVTVSSAS TKGPSVFPPLA PCSRSSTEST AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSVGHV FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLGTRKTYT
CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPCCPAP EFLGGPSVFL FPKPKDTLMI
ISRTPEVTCV VDVSDQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EQFNASRYRV
SVLTVLHQDW WLNKGEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPP
PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEENE SNQPEENNYK TFPVLDSDGS
SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKLSL LSLG

SEQ ID NO: 67
ATGGACTGGA CTTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG CACCAGGTGC
CCACTCCAG GTCCAACCTG TGCACTCAGG GGCTGAAGTG GTGAAGCCTG
GGGCTTCAGT GAAGTTGTCC TGCAAGGCTT CTGGCTACAT CTTACCAGT
TATTATATGT ACTGGGTGAA GCAGGCGCCC GGACAAGGCC TTGAGTGGAT
TGGAGAGATT AATCCTAGCA ATGGTGATAC TAACCTCAAT GAGAAGTTCA
AGAGTAAGGC CACTGACT GTAGACAAAT CCGCCAGCAC AGCATACATG
GAGCTCAGCA GCCTGAGGTC TGAGGACACT CGGCTTATT ACTGTACAAG
ATCGGACGGT AGAAATGATA TGGACTCCTG GGGCCAAAGG ACCCTGGTCA
CCGCTCCTC AGCTTCCACC AAGGGCCCAT CCGTCTTCCC CTGGCGGCC
TGCTCAGAT CTACCTCCGA GAGCACAGCC GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA
GGACTACTTC CCCGAAACCG TGACGGTGTG TGGAACACTA GGCGCCCTGA
CCAGGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCTTC AGGACTCTAC
TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTCCCTCC AGCAGCTTGG GCACGAAGAC
CTACACTGTC AACGTAGATC ACAAGCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
GAGTGTAGTC CAAATATGGT CCCCATGCCC CACCGTGCCT AGCACCTGAC
TTCTGGGGG GACCATCAGT CTTCTGTTTC CCCCACAAAC CCAAGGACAG
TCTCATGATC TCCCGAACCC CTGAGGCTAC GTCCGTGTGT GTGACGTGTA
GCCAGGAAGA CCCCGAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA TGGCGTGGAG

【 図 1 4 - 2 】

GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCCGGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCGCGTA
CCGTGTGGTC AGCGTCTCTA CCGTCTCTCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAG GCCTCCCGTC CTCCATCGAG
AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAGCCAC AAGTGTACAC
CCTGCCCCCA TCCAGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
GCTTGGTCAA AGGCTTCTAC CCACGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCTCCCGC TCCTCGATTG
CGACGGCTCC TTCTTCTCTT ACACGAGGCT AACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGGAGG GAATGTCTTC TCATGTCTCC TGATGCATGA GGCTCTGCAC
AACCCTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCTGGGTT GA

【 図 1 5 】

hu342 κ 軽鎖

SEQ ID NO: 68 (下線を施した配列はシグナル配列である)
MDMRVPAQLL GLLLLLRLRA RCIQMTQSP SLSASVGDV VTIITCRASED
LYYNLAWYQR RFGSGSGSD YTLTISLQPF EDFASYCQQ YKFPFTFGQ
QPEDFASYCQ QYYKFPFTF GQGTVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQBSVTEQDS KDSYLSLST
LTLKADYEK HKVYACEVTH QVLSPPVTKS FNRGEC

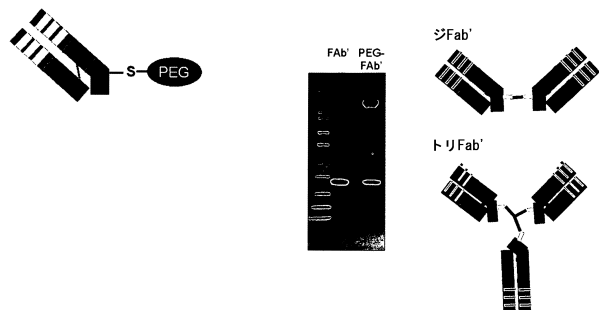
SEQ ID NO: 69 (成熟タンパク質)
DIQMTQSPSS LSASVGDVIT ITCRASEDL YNLAWYQRKP GKAPKLLIYD
TYRLADGVPS RFGSGSGSD YTLTISLQPF EDFASYCQQ YKFPFTFGQ
GTYKVEIKRTV AAPSVEIFFP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWQV
DNALQSGNSQ BSVTEQDSK STYLSLSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQ
LSSPVTKSPN RGEK

SEQ ID NO: 70 (オープンリーディングフレーム)
ATGGACATGA GGGTCCCGC TCAGCTCTCG GGGCTCTGCT TACTCTGGCT
CCGAGGTGCC AGATGTGATA TCAGATGAC CCAGAGTCCA AGCAGTCTCT
CCGCCAGCGT AGGCGATCGT GTGACTATTA CCGTCTGTCG CAGTGAGGAC
CTCTATTACA ACCTGGCCTG GTATCAGCGT AAACCGGGCA AAGCCCGAA
GCTGCTCMTG TATGATACGT ACCGCTCGG TGACGGTGTG CCAAGCCGTT
TCAGTGGCAG TGGCAGCGGT ACTGACTATA CCGTCAAAAT TTCGTCCTC
CAGCCGGAAG ATTTCCGCTC TTAATATGT CAGCAATATT ACAAGTTCCC
TTTCACTTC GGTCAAGGCA CTAAGTAGA AATCAAACTG ACGGTGGCTG
CACCATCTGT CTTTCTCTC CCGCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
ACTGCCCTCTG TTGTGTGCTT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCCGGTAA CCCCAGGAGA
GTGTACACAGA CACAGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCTC CAGCAGCAC
CTGACGCTGA GCAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAGTCTC ACGCTGCGA
AGTCAACCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAGAGG TTCAACAGG
GAGAGTGTTA G

【 図 1 6 - 2 】

GCCAGGAAGA CCCCAGGCTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA TGGCGTGGAG
GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCCGGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCGCGTA
CCGTGTGGTC AGCGTCTCTA CCGTCTCTCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAG GCCTCCCGTC CTCCATCGAG
AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAGCCAC AAGTGTACAC
CCTGCCCCCA TCCAGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCTCCCGC TCCTCGATTG
CGACGGCTCC TTCTTCTCTT ACACGAGGCT AACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGGAGG GAATGTCTTC TCATGTCTCC TGATGCATGA GGCTCTGCAC
AACCCTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCTGGGTT GA

【 図 1 7 】



【 図 1 6 - 1 】

hu342 aglyP-hulG4重鎖

SEQ ID NO: 71 (下線を施した配列はシグナル配列である)
MDWTWRVFCL LAVAPGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAVSGFSSTN
YHVHWVRQAP GKLEWWMGVI WGDGDTSYNS VLKSRFTISR DTSKNTVYVQ
MNSLRRAEDTA VYCARQLTH YYVLAAGQG TLTVTSSAST KGPSVFLAP
CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
SLSSVVTVPV SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRRESKYG PPCPCPPAPE
FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSDQEDPE QFNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQFNAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYCKVK SNKGLPSSIE
KTRISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGIFY PSDIAVEWES
NQGPENNYKT TTPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH
NHYTQKLSL SLG

SEQ ID NO: 72 (成熟タンパク質: S228P/T299A変異に下線を施し、太字で示す)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFSST NYHVHWVRQA PGKLEWWMGV
IWGDGDTSYN SVLKSRFTIS RDTSKNTVYL QMNSLRRAEDT AVYYCARQLT
HYVLAAGWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFLPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
FPPEVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVPV SSSLGKTYT
CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPCPPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
ISRTPPEVTCV VDVSDQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EQFNAYRV
VSVLTVLHQD WLNGKEYCKK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPP
SQEEMTKNQ VSLTCLVKGIF YPSDIAVEWE SNGQENNYK TTPVLDSDGS
SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKLSL LSLG

SEQ ID NO: 73
ATGGACTGGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG CACCAGGTGC
CCACTCCGAA GTACAATTGG TCGAGTCTGG AGGCGGGCTT GTCCAGCCTG
GTGGGAGCCT GCGTCTCTCT TGTGCAGTGA CGCGCTTACG CTCTACCAAT
TACCATGTGC ACTGGGTGCG TCAGGCACCT GGAAGGGGCC TGGAGTGAAT
GGGTGTTATT TGGGGCGAGC GCGATACATC CTACAACCTC GTCCTGAAGA
GCCGTTTAC CATTTCCCGT GACACCTCAA AGAATACCGT TTAACCTCAG
ATGAACCTCT TCCGCGCAGA GGACACAGCA GTCTATTACT GTGCACGTCA
ACTGACCCAC TATTACGTTT TGGCAGCCTG GGTCAAGGG ACTCTGGTCA
CAGTCTCGAG CGCTTCAACC AAGGGCCCAT CCGTCTTCCC CTGGCGGCC
TGCTCCAGAT CTACTCCGA GAGCACAGCC GCCTGGGCTG GCTGGTCAA
GACTACTTTC CCGAACCCG TGACGGTGTG GTGGAACCTA GCGCCCTCA
CCAGCGGGCT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCTCC AGGACTCTAC
TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACGAAGAC
CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCGAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
GAGTGTAGTC CAAATATGTT CCCCCTATGC CACCGTGCC AGCACCTGAG
TTCCTGGGGG GACCATCAGT CTTCTGTGTC CCCCCAAAAC CCAAGGCAC
TCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA

【 図 1 8 】

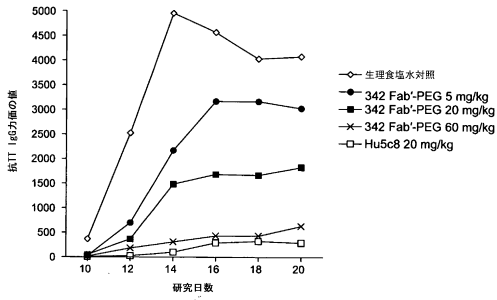
342Fab' 実体および342Fab'-PEG実体の活性プロファイル

Table with 5 columns: Antibody, Kd Biacore (pM), CD40 結合 IC50 (ng/ml), ICAM-1 上方制御 IC50 (ng/ml), and 競合結合アッセイ法 IC50 (pM). Rows include hu5c8 IgG1, 342 Fab', 342 Fab'-PEG, 342 Fab', 342 Fab'-PEG, 342 トリ Fab', 342 トリ Fab'-PEG, and 342 アグリコシルIgG4.

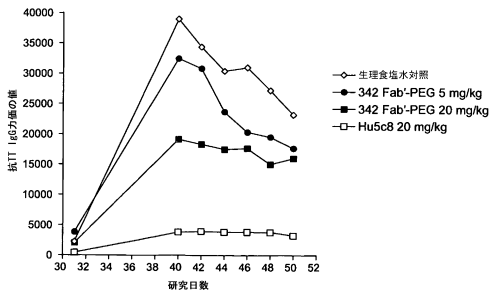
【図19】

カンクイザルにおける破傷風トキソイドに対するIgG免疫応答の阻害

TTに対する一次免疫応答

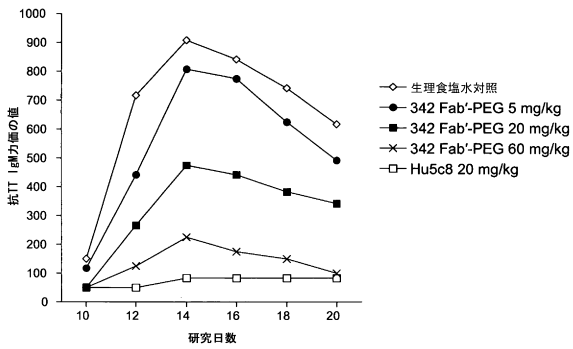


30~50日目のTTに対する免疫応答



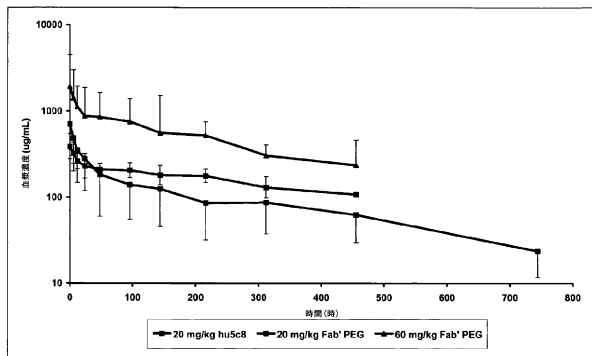
【図21】

カンクイザルにおける破傷風トキソイドに対するIgM一次免疫応答



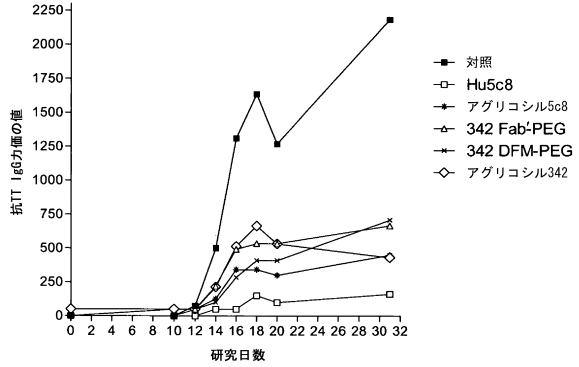
【図22】

カンクイザルにおける342Fab'-PEGの薬物動態

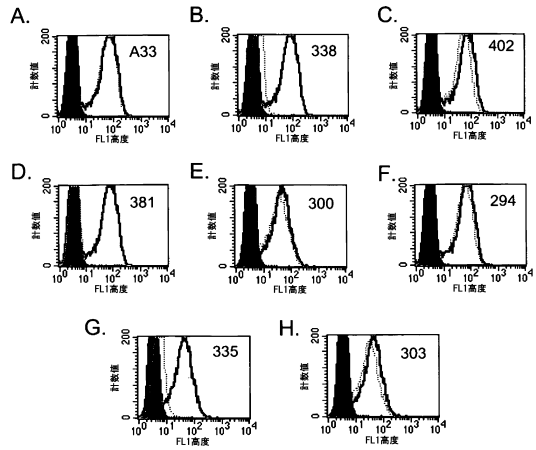


【図20】

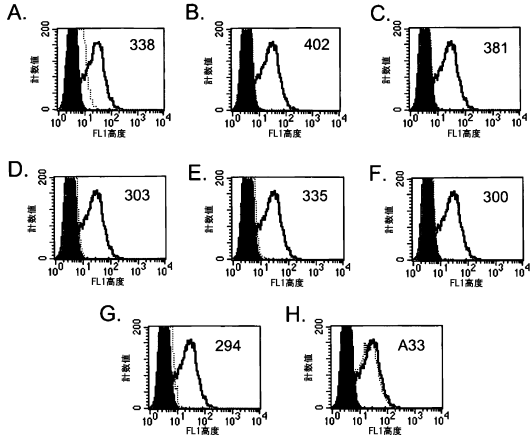
カンクイザルにおける破傷風トキソイドに対するIgG免疫応答の阻害



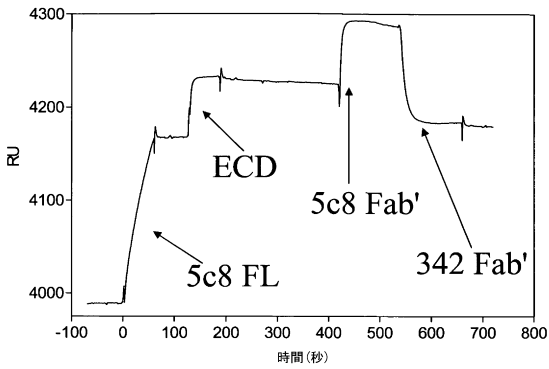
【図23】



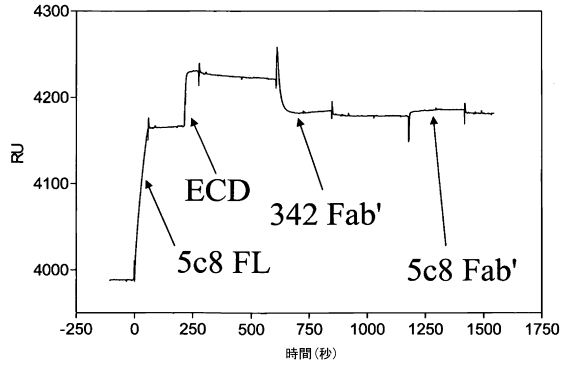
【 図 2 4 】



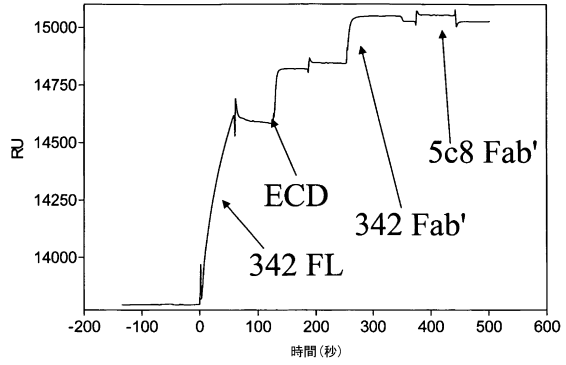
【 図 2 5 A 】



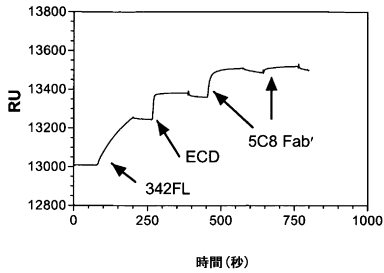
【 図 2 5 B 】



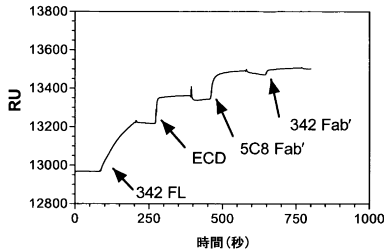
【 図 2 5 C 】



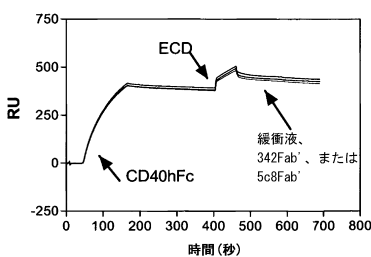
【 図 2 5 D 】



【 図 2 5 E 】

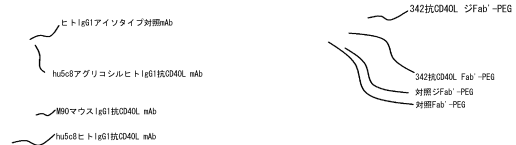
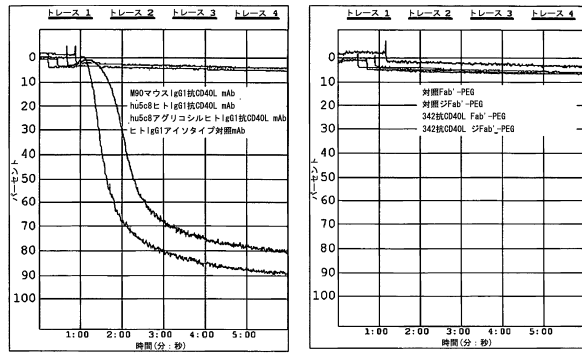


【 図 2 5 F 】

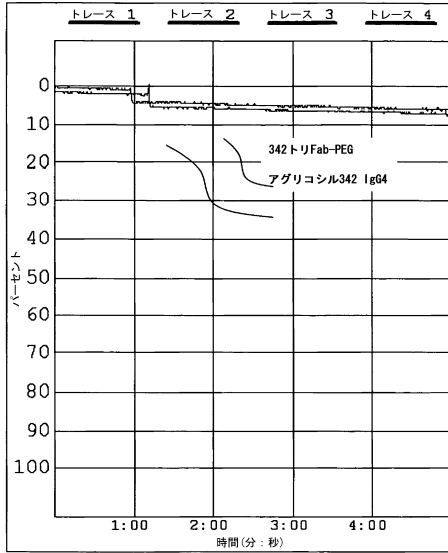


【 図 2 6 - 1 】

rhsCD40L/抗体複体に応答した、
代表的な血小板凝集(アッセイ法1)

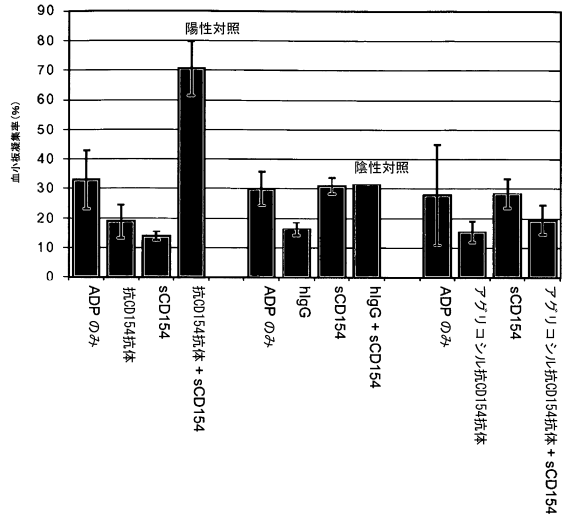


【 図 26 - 2 】



【 図 27 】

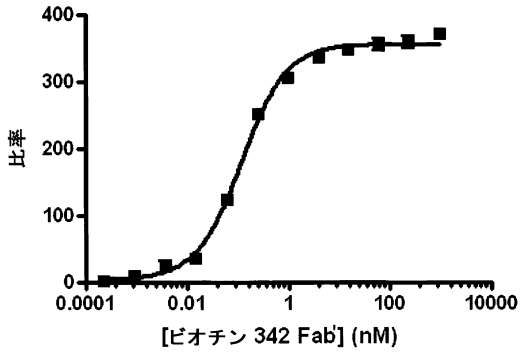
対照抗体および抗CD154抗体に反応した、
代表的な血小板凝集(アッセイ法2)



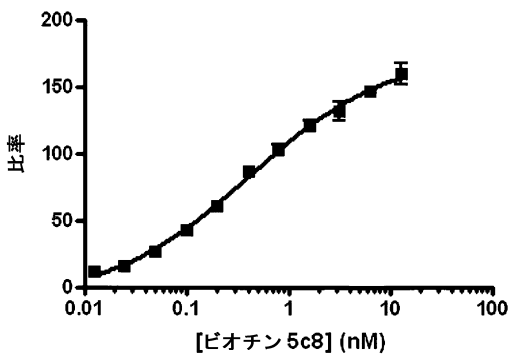
【 図 28 】

	1		3		1			
ヒト可溶性CD40L	GDQNPQIA	AHVISEASSK	TTSVLQWAKK	GYTMSNNLV	TLRNGKQLTV			
マウス可溶性CD40L	GDSDPQIA	AHVVSSEANEN	AASVLQWAKK	GYTMSNNLV	MLRNGKQLTV			
	5	1	2	6	1	6	5	6
ヒト可溶性CD40L	KRQGLYIYYA	QVTFPCSNREA	SSQAPFIASL	CLKSPQRFER	ILLRAANTHS			
マウス可溶性CD40L	KREGLYVYVT	QVTFPCSNREP	SSQRPPIVGL	WLKFPSSGSEK	ILLKAANTHS			
	2	1	5	3	4			
ヒト可溶性CD40L	SAKPCGQOSI	HLGGVFLQF	GASVFNVTD	PSQVSHKTFG	TSPGLLKL			
マウス可溶性CD40L	SSQLCRQQSV	HLGGVFLQF	GASVFNVTQ	ASQVIRVQF	SSPGLLKL			

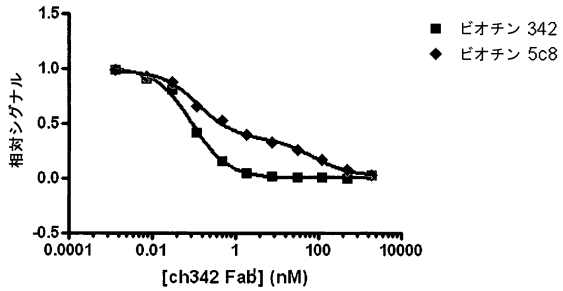
【 図 29 A 】



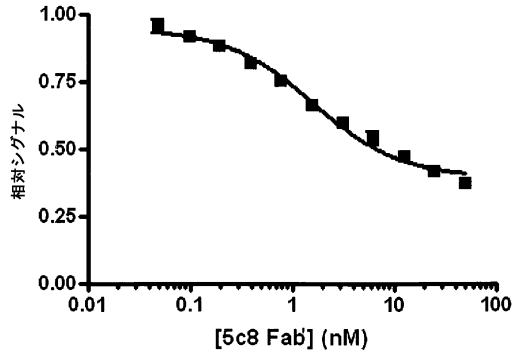
【 図 29 B 】



【 図 29 C 】



【 図 29 D 】



【配列表】

0005721951000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	

(31)優先権主張番号 60/920,495

(32)優先日 平成19年3月27日(2007.3.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
- (74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 バークリー リンダ シー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェスト ニュートン ウィンスロップ ストリート 3
4
- (72)発明者 フェラント - オーゲッタス ジャニーン エル .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 グロスター グレンメア アベニュー 8
- (72)発明者 ガーバー エレン エー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ドネル ストリート 14
- (72)発明者 スー イェン ミン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン ダグラス ロード 3
- (72)発明者 スー リヘ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 リーディング メイン ストリート 976
- (72)発明者 テイラー フレドリック アール .

- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ミルトン ガリバー ストリート 98
- (72)発明者 アダムス ラルフ
イギリス国 スロウ パークシャー バス ロード 208 ユーシービー セルテック
- (72)発明者 ブラウン デレク トーマス
イギリス国 スロウ パークシャー バス ロード 208 ユーシービー セルテック
- (72)発明者 ポプルウェル アンドリュー ジョージ
イギリス国 スロウ パークシャー バス ロード 208 ユーシービー セルテック
- (72)発明者 ロビンソン マーティン キム
イギリス国 スロウ パークシャー バス ロード 208 ユーシービー セルテック
- (72)発明者 ショック アンソニー
イギリス国 スロウ パークシャー バス ロード 208 ユーシービー セルテック
- (72)発明者 タイソン ケリー ルイーズ
イギリス国 スロウ パークシャー バス ロード 208 ユーシービー セルテック

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第2006/033702(WO, A1)
国際公開第2006/030220(WO, A1)
国際公開第2002/018446(WO, A1)
特表2003-526371(JP, A)
特表2007-504804(JP, A)
Int. Immunopharmacol., (2001), 1, [2], p.277-294
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996), 93, [15], p.7843-7848
Protein Sci., (2006), 15, [1], p.14-27
Nat. Biotechnol., (2005), 23, [10], p.1257-1268

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
C07K 16/00 - 16/46
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq